



Universidade de Aveiro
Ano 2015

Departamento de Química

Vanessa Mariana IMPACTO DA OBESIDADE NO SISTEMA
Melo Cabral CARDIOVASCULAR: PAPEL REGULADOR DA
ATIVIDADE FÍSICA

OBESITY IMPACT ON THE
CARDIOVASCULAR SYSTEM: REGULATORY
ROLE OF PHYSICAL ACTIVITY



Universidade de Aveiro
Ano 2015

Departamento de Química

Vanessa Mariana **IMPACTO DA OBESIDADE NO SISTEMA**
Melo Cabral **CARDIOVASCULAR: PAPEL REGULADOR DA**
ATIVIDADE FÍSICA

OBESITY IMPACT ON THE
CARDIOVASCULAR SYSTEM: REGULATORY
ROLE OF PHYSICAL ACTIVITY

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor Fernando Manuel Tavares da Silva Ribeiro, Professor Adjunto da Escola Superior de Saúde da Universidade de Aveiro, do Doutor Daniel Moreira Gonçalves, Investigador de pós-doutoramento do Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica do Centro de Investigação Médica da Universidade do Porto e da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da European-Commission grant FP7-Health-2010; MEDIA-261409.



“Never give up on something that you can’t go a day without thinking about.”

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Inês Maria Falcão Sousa Pires Marques

professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores, Prof. Doutor Fernando Ribeiro e Prof. Doutor Daniel Gonçalves, e especialmente à Prof. Doutora Rita Ferreira que me acompanhou mais de perto durante todo este ano de trabalho, gostaria de agradecer pela incansável orientação científica, pela disponibilidade e pelas críticas construtivas que me permitiram melhorar e enriquecer a minha prática e os meus conhecimentos científicos.

Gostaria também de agradecer à Rita Nogueira Ferreira pelo apoio e ajuda prestada nos trabalhos laboratoriais realizados.

Aos meus amigos Margarida, Vanessa, João (Noddy) e Sofia gostaria de agradecer por toda a força e incentivo que me deram neste ano, sem eles não conseguiria chegar onde cheguei, foram sempre incansáveis em tudo. Muito obrigada por tudo do fundo do coração.

Aos amigos que fiz em Aveiro durante estes cinco anos que sempre me acompanharam e me marcaram muito, obrigada pelas conversas, saídas, diversão e tudo mais.

Em último, gostaria de agradecer a toda a minha família, sem eles nada disto teria sido possível. Em especial à minha Madrinha Carla, ao meu tio José que tem sido sempre como um padrinho para mim e à minha priminha Bia que sempre estiveram aqui para mim e que me ajudaram muito. Também aos meus avós Ana e Carlos que sempre me apoiaram em tudo. À minha irmã para que ela saiba que eu gosto muito dela. E gostaria finalmente de agradecer muito à minha mãe pelo incansável apoio, pelo carinho, pela força gigante e por ser sempre o meu pilar durante os bons e os maus momentos da minha vida, tendo feito sempre tudo por mim e para me ver bem.

O meu sincero obrigado a todos vós, porque aquilo que eu sou hoje, só a vocês o devo.

palavras-chave

Doenças cardiovasculares, Exercício físico, Obesidade, Inflamação, Stress oxidativo

resumo

A prevenção e tratamento da obesidade constituem um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI. Uma das estratégias que tem sido indicada para modular a obesidade é a prática de exercício físico, dado que reduz a gordura corporal e tem impacto benéfico sobre o sistema cardiovascular. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes permanecem pouco conhecidos. Assim o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o papel do exercício físico na obesidade e no risco de doenças cardiovasculares associadas a esta condição pela análise integrada de hormonas envolvidas na regulação do apetite e mediadores inflamatórios. Nesse sentido, utilizou-se um modelo animal de ratos ZSF1 magros e obesos, em que um grupo de animais obesos foi submetido a um protocolo de exercício físico em tapete rolante durante 4 semanas, 1h/dia a uma velocidade de 15m/min.

Os resultados não evidenciaram alterações significativas do peso corporal e da massa do músculo *gastrocnemius* e do coração induzidas pelo exercício físico nos animais obesos. O exercício físico também não modulou significativamente os níveis plasmáticos de colesterol total nem de triacilglicerídeos, apesar de ter contrariado a diminuição dos níveis da lipase HSL observada em animais obesos. Os níveis das hormonas envolvidas na regulação do apetite, adiponectina, leptina e grelina também não foram modulados pelo exercício físico em obesos. O efeito benéfico do exercício físico foi evidenciado sobretudo pela modulação dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-6, em níveis significativamente mais elevados em animais obesos sedentários, e da miocina irisina, detetada em níveis significativamente mais baixos nestes animais. Esta miocina parece modular a atividade do tecido adiposo e do músculo cardíaco, tendo-lhe sido atribuído um papel cardioprotetor. Os resultados sugerem que exercício físico pode constituir uma abordagem terapêutica para a obesidade e doenças cardiovasculares atendendo ao seu papel anti-inflamatório e cardioprotetor.

keywords

Cardiovascular diseases, Physical exercise, Obesity, Inflammation, Oxidative stress

abstract

The prevention and treatment of obesity is one of the greatest public health challenges of the twenty-first century. One of the therapeutic strategies that has been indicated for the prevention and control of obesity is exercise training, since it reduces body fat and has a beneficial impact on the cardiovascular system. However, the underlying molecular mechanisms remains largely unknown. Thereby, this study aimed to evaluate the role of exercise training in obesity and in the risk of related cardiovascular diseases through the integrated analysis of hormones involved in the control of appetite and mediators of inflammation. In this sense, we used an animal model ZSF1 of lean and obese rats. A group of obese animals was subjected to treadmill exercise for 4 weeks at a speed of 15m/min, 1hour/day.

Our results showed no significant alterations of body weight, gastrocnemius muscle mass and heart weight upon exercise training. The significantly higher plasmatic levels of total cholesterol and triacylglycerides observed in obese rats were not modulated by exercise training, contrary to the decrease of HSL lipase levels observed in obese animals. Concomitantly, we did not observed significant alterations of the levels of the hormones involved in the regulation of appetite, such as adiponectin, leptin and ghrelin promoted by lifestyle. The beneficial effect of exercise training was mainly noticed in the regulation of the pro-inflammatory cytokine IL-6, which was significantly higher levels in sedentary obese rats, and of the myokine irisin that was in significantly lower levels in the plasma of these animals. This myokine seems to modulate not only the adipose tissue but also heart remodelling, having been assigned to irisin a cardioprotective role. Taken together, the results suggest that exercise training might be seen as a therapeutic approach for the management of obesity and related cardiovascular diseases, given its anti-inflammatory and cardioprotector effect.

ÍNDICE

Índice de figuras e tabelas	III
Abreviaturas.....	V
I. Introdução.....	1
II. Revisão da literatura	3
1. Alterações sistêmicas promovidas pela obesidade	3
1.1. O papel da adiponectina na obesidade.....	5
1.2. O papel da leptina na obesidade	10
1.3. Contribuição do stress oxidativo para as alterações sistêmicas associadas à obesidade.....	11
1.4. Impacto da obesidade na homeostasia cardiovascular	12
2. Exercício físico como abordagem terapêutica/ preventiva de doenças cardiovasculares e da obesidade	14
2.1. Mecanismos moleculares modulados no sistema cardiovascular pelo exercício físico.....	16
3. Biomarcadores para avaliação do risco de doenças cardiovasculares associadas à obesidade	18
III. Objetivos.....	23
IV. Material e Métodos.....	25
1. Protocolo animal.....	25
2. Doseamento da proteína total	26
3. Doseamento de colesterol total e de triacilglicerídeos	26
4. Immunoblotting	27
5. Análise estatística	28
V. Resultados e Discussão.....	29
1. Estudo do impacto do exercício físico nos animais obesos	29

1.1. Avaliação de parâmetros antro- e morfométricos.....	29
1.2. Avaliação do impacto da obesidade e da atividade física no metabolismo e proteínas reguladoras do apetite	30
1.3. Avaliação do impacto da obesidade e da atividade física na resposta inflamatória.....	34
VI. Conclusões.....	43
VII. Bibliografia.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Mecanismos que relacionam a obesidade com a doença cardiovascular. A obesidade abdominal está associada com a resistência à insulina, o stress oxidativo e o aumento dos níveis de diferentes adipocinas e marcadores inflamatórios, os quais conduzem à disfunção endotelial (Adaptado de (19)).	4
Figura 2- Principais efeitos da adiponectina no organismo (Adaptado de (12)).	6
Figura 3- A adiponectina (Ad) liga ao terminal COOH extracelular do recetor de adiponectina 1 (AdipoR1) e recruta a APPL1 para o terminal NH ₂ do AdipoR1 intracelular que ativa o AMPK e o p38 MAPK. O AMPK ativado fosforila e inativa a acetil-CoA carboxilase (ACC), resultando na oxidação dos ácidos gordos. O AMPK ativado fosforila também a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), levando à formação de proteínas de choque térmico (HSP90) e à produção de NO para mediar o efeito vasodilatador da adiponectina. A AMPK inibe a via do IKK/NF-κB. A ligação da adiponectina ao AdipoR1 estimula a translocação do transportador de glucose-4 (GLUT-4) e a absorção de glucose através da AMPK fosforilada e do p38 MAPK fosforilado (Adaptado de (34)).	8
Figura 4- Mecanismo de ação da adiponectina (Adaptado de (52)).	9
Figura 5- Efeitos da adiponectina sobre a função das células endoteliais (Adaptado de (36)).	9
Figura 6- Mecanismos associados à interação entre doença cardiovascular e obesidade (Adaptado de (53)).	13
Figura 7- Mecanismos associados aos efeitos sistémicos e cardíacos induzidos pela prática regular de exercício físico. IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; PGC-1α: Peroxissoma ativado pelo proliferador do recetor gama co-ativador 1-alfa; PLB: fosfolamban; SERCA2a: sarco/retículo endo-plasmático Ca ²⁺ - ATPase, 2a (Adaptado de (56)).	15
Figura 8- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de adiponectina avaliado pelo slot blot.	32
Figura 9- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de grelina avaliado pelo slot blot.	33

Figura 10- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de leptina avaliado pelo slot blot.....	34
Figura 11- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico e nos níveis plasmáticos de HSL avaliado pelo slot blot.....	35
Figura 12- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de PCR avaliado pelo slot blot.....	36
Figura 13- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico e nos níveis plasmáticos de IL-6 avaliado pelo slot blot.....	37
Figura 14- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico e nos níveis plasmáticos de TWEAK avaliado pelo slot blot.....	38
Figura 15- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de proteínas nitradas avaliado pelo slot blot.	40
Figura 16- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de irisina avaliado pelo slot blot.....	41
 Tabela 1 – Caracterização dos grupos experimentais em termos de peso corporal, massa de coração e de massa do <i>gastrocnemius</i>	30
Tabela 2 – Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nas concentrações de proteína total, colesterol total e triacilglicerídeos no plasma dos animais dos grupos <i>Lean</i> , <i>Ob</i> e <i>Ob+Ex</i>	31

ABREVIATURAS

AdipoR1 – recetor de adiponectina 1	IRS-2 – substrato do recetor de insulina-2
AdipoR2 – recetor de adiponectina 2	JAK – cinase de Janus
ADP – adenosina difosfato	JNK – proteína cinase c-Jun N-terminal
ADPS – <i>N</i> -etil- <i>N</i> - sulfopropil- <i>N</i> -anisidina	LDL – lipoproteína de baixa densidade
AMP – adenosina monofosfato	LDL-ox – lipoproteína de baixa densidade oxidada
AMPK – proteína cinase ativada por AMP	MAP 2 – proteína cinase ativada por mitogénio 2
ANC – número absoluto de neutrófilos	MAPK – proteína cinase ativada por mitogénio
ApoE – apolipoproteína E	MCP-1 – proteínas quimiotáticas de monócitos-1
APPL1 – proteína adaptadora, interação fosfotirosina, domínio PH e fecho de leucina 1	M-CSF – fator estimulador de colónias de macrófagos
ATP – adenosina trifosfato	MEF – fator potenciador de miócitos
AVC – acidente vascular cerebral	MnSOD – superóxido dismutase dependente de manganês
BNP – peptídeo natriurético tipo B	MPO – mieloperoxidase
BSA – albumina sérica bovina	NADPH – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
CAMs – moléculas de adesão molecular	NF-κB – fator de transcrição nuclear kappa B
CT – colesterol total	NO – óxido nítrico
DCC – <i>N</i> , <i>N'</i> -diciclo-hexilcarbodiimida	NOS – óxido nítrico sintase
DM 2 – diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	OMS – organização mundial da saúde
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial	PA – ativador do plasminogénio
FFA – ácidos gordos livres	PAI-1 – inibidor-1 do ativador do plasminogénio
F/T – rácio ferritina/saturação de transferrina	PCR – proteína C reativa
gAd – adiponectina globular	PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase
GLUT-4 – transportador de glucose-4	
Hcys – homocisteína	
HDL – lipoproteína de alta densidade	
HSL – lípase sensível a hormona	
HSPs – proteínas de choque térmico	

HSP70 – proteínas de choque térmico de 70 quilodalton	PPAR- α – recetor ativado pelo proliferador de peroxissomas-alfa
ICAM-1 – moléculas de adesão intercelular-1	ROS – espécies reativas de oxigénio
I κ B – inibidor de NF- κ B	SAA – proteína sérica amilóide A
IKK – inibidor da cinase do NF- κ B	STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição
IL-1 – interleucina-1	tAd – adiponectina trimérica
IL-1 β – interleucina-1-beta	TG – triacilglicerídeos
IL-4 – interleucina-4	TGF- β – fator de transformação de crescimento-beta
IL-6 – interleucina-6	TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa
IL-8 – interleucina-8	TTP – tristetraprolina
IL-10 – interleucina-10	VCAMs – moléculas de adesão celular vascular
iNOS – óxido nítrico sintase induzida	VEGF – fator de crescimento endotelial vascular
IR – recetor de insulina	
IRS – substrato do recetor de insulina	
IRS-1 – substrato do recetor de insulina-1	

I. INTRODUÇÃO

A prevenção e tratamento da obesidade constituem um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI. Nos países com economias emergentes a obesidade na infância tem vindo a aumentar cerca de 30%, sendo este maior do que nos países desenvolvidos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2013 mais de 42 milhões de crianças com idades inferiores a 5 anos tinham excesso de peso ou eram obesas (1). A obesidade está associada a dificuldades respiratórias, maior risco de fraturas, hipertensão, níveis elevados de marcadores de doenças cardiovasculares e resistência à insulina (2–4). A acumulação anormal ou excessiva de gordura aumenta a morbilidade e mortalidade por doenças associadas (5–7). Entre as doenças crónicas associadas à obesidade é de destacar a diabetes *mellitus* tipo 2 (DM 2), as doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro (tais como o cancro do endométrio, da mama e do cólon) (2,8). As doenças cardiovasculares constituíram a principal causa de morte em 2012, estimando-se que 7,3 milhões foram devido a doenças coronárias e 6,2 milhões foram devido a acidente vascular cerebral (AVC) (9). Cerca de 9,4 milhões de mortes por ano, que representam 16,5% de todas as mortes, podem ser atribuídas à pressão arterial elevada, o que inclui 51% das mortes por AVC e 45% das mortes por doença coronária (10).

Nas últimas décadas têm surgido evidências de que o risco de doença cardiovascular começa durante a gestação e prolonga-se até à idade adulta (11). A OMS reconhece que o aumento da prevalência da obesidade infantil constitui um problema social cujo controlo e/ou erradicação exige uma abordagem multidisciplinar e multicultural da população (1). A implementação de programas de sensibilização para a adoção de um estilo de vida saudável é fundamental para contrariar o aumento de doenças relacionadas com a obesidade. Para o efeito são necessárias evidências bioquímicas e clínicas das vantagens de um estilo de vida ativo e de uma nutrição adequada para a promoção da saúde.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. ALTERAÇÕES SISTÊMICAS PROMOVIDAS PELA OBESIDADE

O tecido adiposo é um órgão de armazenamento de energia que também funciona como órgão endócrino, produzindo numerosas adipocinas que são citocinas, ou seja, proteínas celulares sinalizadoras. A produção ou a secreção desregulada de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias causadas pela disfunção dos adipócitos parece levar ao aparecimento de complicações ligadas à obesidade. De fato, a inflamação é diretamente proporcional ao aumento da adiposidade corporal (12). No processo de inflamação os macrófagos são atraídos ao local afetado, sendo a infiltração destas células proporcional ao tamanho dos adipócitos, podendo ocorrer um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de fase aguda. Estas proteínas podem ser produzidas e secretadas tanto pelos adipócitos hipertrofiados como pelos macrófagos podendo assim contribuir para o aumento da obesidade (13,14).

Do ponto de vista metabólico, a obesidade é uma condição complexa e está associada a níveis elevados de ácidos gordos livres (FFA) no sangue (15), que se devem à presença de grandes massas de tecido adiposo que libertam consecutivamente mais FFA e que podem estimular sinais pró-inflamatórios (16). Estes sinais pró-inflamatórios ativam nos adipócitos vias de sinalização, como a via do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B), sendo este um mediador da resistência da insulina, pois em indivíduos obesos vai atuar em tecidos que têm resposta à insulina e promover o desenvolvimento da resistência à insulina (17). Por outro lado, é induzida uma resposta inflamatória crônica de baixo grau que se caracteriza pelo aumento dos níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) e a proteína sérica amilóide A (SAA) assim como de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8), e proteínas multifuncionais, tais como a leptina e a osteopontina (15). Estima-se que mediadores pró-inflamatórios como a IL-6 e a IL-8 estejam aumentados cerca de 30% em indivíduos obesos (18). A IL-6 estimula a secreção da proteína de fase aguda PCR pelo fígado, cujos níveis se encontram aumentados em indivíduos obesos, estando estes correlacionados com a quantidade de gordura corporal (19). Na inflamação associada à obesidade os níveis de SAA encontram-

se também aumentados, tendo-se sugerido que a expressão do gene que codifica a SAA está também aumentada no tecido adiposo de indivíduos obesos, relacionando-se com o tamanho dos adipócitos (20). A disfunção endotelial aumenta com a obesidade, esta decorre de um desequilíbrio entre os níveis de fatores endoteliais vasodilatadores e de fatores endoteliais vasoconstritores (21), que conduzem a um aumento da reatividade vascular (22). Um dos fatores endoteliais vasodilatadores é o óxido nítrico (NO) e quando a sua biodisponibilidade diminui, devido a uma menor produção via a enzima óxido nítrico sintase (NOS) ou pela inativação por espécies reativas de oxigénio (ROS), ocorre disfunção endotelial (**Figura 1**) (23).

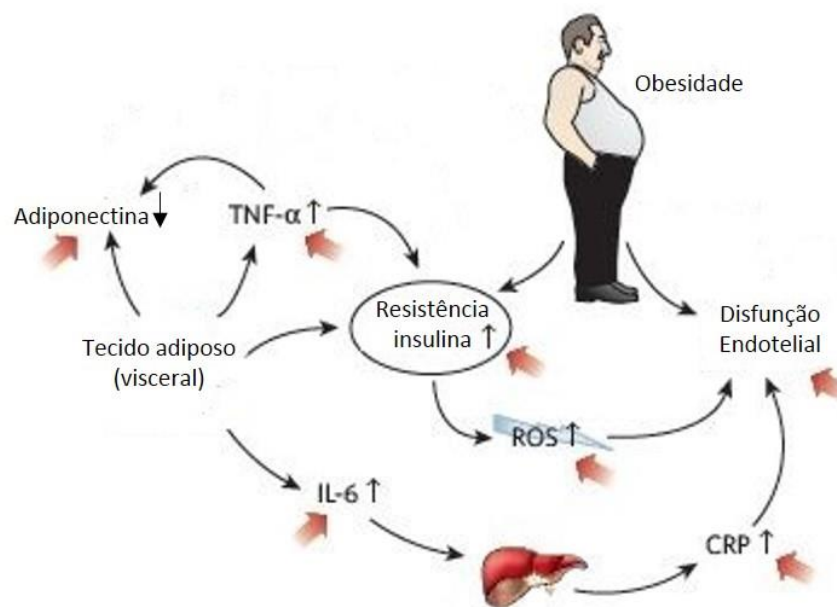


Figura 1- Mecanismos que relacionam a obesidade com a doença cardiovascular. A obesidade abdominal está associada com a resistência à insulina, o stress oxidativo e o aumento dos níveis de diferentes adipocinas e marcadores inflamatórios, os quais conduzem à disfunção endotelial (Adaptado de (19)).

A ativação da resposta imune na obesidade é mediada por vias de sinalização específicas, como o complexo enzimático com atividade serina cinase (JNK e IKK), que estão implicados na inibição da atividade da tirosina-cinase do recetor da insulina (IR). Neste caso a ativação da proteína cinase c-Jun N-terminal (JNK) e do complexo inibidor da cinase do fator nuclear kappa-B (IKK) bem como a supressão da via de sinalização mediada pelo recetor de insulina e os seus substratos parecem constituir os mecanismos

moleculares pelos quais o TNF- α conduz à resistência à insulina através da fosforilação do complexo JNK e do IR (24,25). O NF-kB é um fator de transcrição ativado por estímulos inflamatórios e leva à produção de numerosas citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α e a IL-6. Este fator de transcrição é inibido pelo I κ B (inibidor do kappa B) e após a ativação dos estímulos pró-inflamatórios, o complexo de cinase IKK é ativado e catalisa a fosforilação de I κ B, levando à sua degradação e à libertação do NF-kB que vai estimular a transcrição de mediadores inflamatórios (17). O inibidor-1 do ativador do plasminogénio (PAI-1) é expresso no tecido adiposo durante a acumulação de gordura. Assim, os níveis plasmáticos de PAI-1 correlacionam-se positivamente com o teor de tecido adiposo nos humanos, contribuindo potencialmente para a patogénese de doenças trombóticas associadas à obesidade, visto que o ativador do plasminogénio (PA) transforma o plasminogénio em plasmina ajudando na degradação dos coágulos e prevenindo a trombose (18).

1.1. O PAPEL DA ADIPONECTINA NA OBESIDADE

A adiponectina é uma hormona de natureza proteica, sintetizada e secretada pelos adipócitos maduros, sendo libertada na circulação a um ritmo elevado (26). Esta hormona exerce efeitos a vários níveis como o controlo da ingestão alimentar, a homeostasia energética, a proteção contra a aterosclerose e o aumento da sensibilidade à insulina (**Figura 2**).

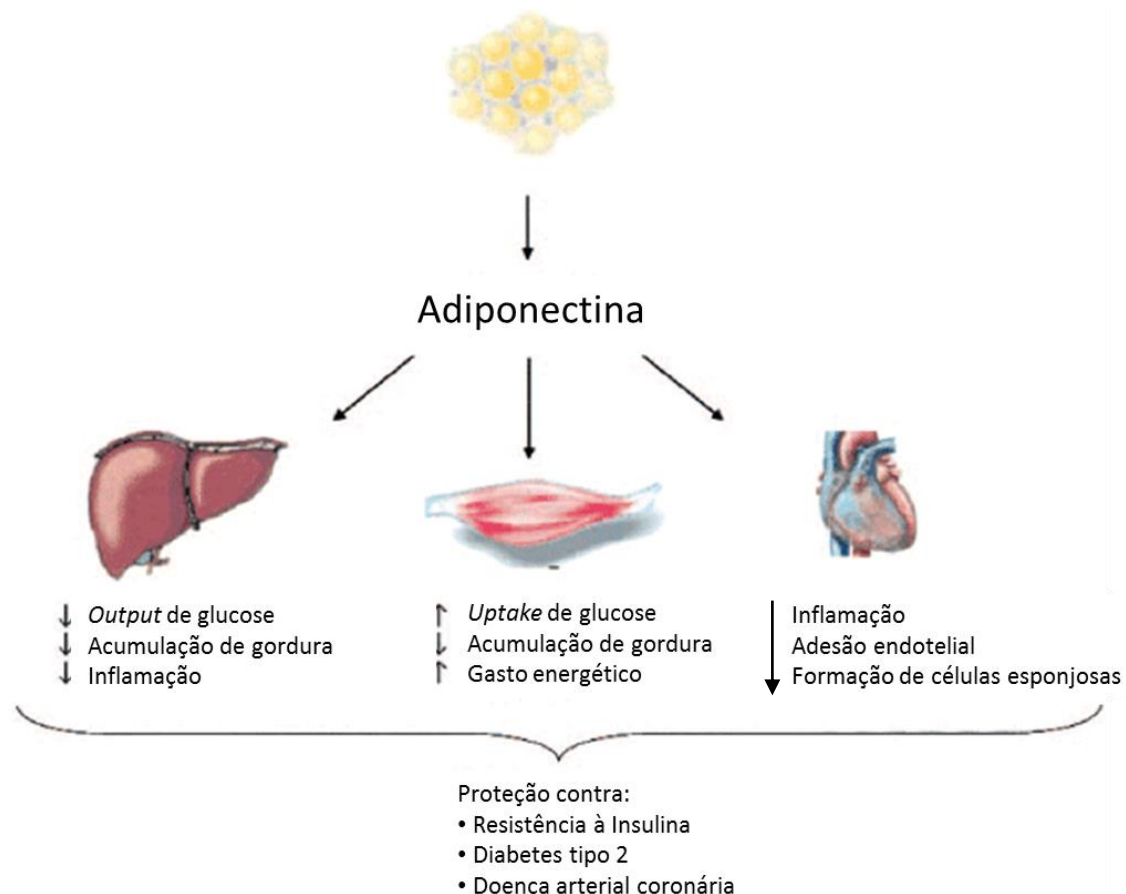


Figura 2- Principais efeitos da adiponectina no organismo (Adaptado de (12)).

Os níveis séricos desta hormona são baixos em indivíduos obesos, induzindo disfunção endotelial. De fato, os níveis de adiponectina estão inversamente correlacionados com a obesidade e complicações associadas (27), já que possui um papel importante na regulação do metabolismo de ácidos gordos e de processos inflamatórios (28). A redução dos níveis de adiponectina em indivíduos obesos pode ser explicada pela inibição da sua transcrição ou diminuição da sua secreção promovida por citocinas pró-inflamatórias (29).

A adiponectina atua através de dois recetores transmembranares com sete domínios, o recetor de adiponectina 1 (AdipoR1) e o recetor de adiponectina 2 (AdipoR2). O AdipoR1 é expresso predominantemente no músculo-esquelético e tem preferência para a adiponectina globular (gAd), enquanto o AdipoR2 é expresso predominantemente no fígado e tem preferência para a adiponectina trimérica (tAd) bem como para a adiponectina globular (30). No tecido adiposo podem ser encontrados os dois tipos de

recetores de adiponectina. A forma globular da adiponectina encontra-se em circulação em pequenas quantidades e resulta da clivagem proteolítica da adiponectina trimérica pela elastase secretada pelos monócitos ativados e pelos neutrófilos, apresentando ações biológicas distintas da adiponectina trimérica (31). A adiponectina atua via proteína cinase ativada por AMP (AMPK), tanto no fígado como no músculo-esquelético resultando na estimulação da oxidação de ácidos gordos e na diminuição dos níveis de triacilglicerídeos (TG) e FFA (32). Uma menor ativação de AdipoR2 promove a diminuição da atividade das vias de sinalização do recetor ativado pelo fator de transcrição proliferador de peroxissomas-alfa (PPAR- α) que desempenha um papel essencial na regulação da oxidação dos ácidos gordos. Uma menor estimulação do AdipoR1 causa uma redução da ativação de AMPK e, conseqüentemente, a acumulação de lípidos, indução da inflamação e comprometimento da sensibilidade à insulina. Os efeitos metabólicos da adiponectina são mediados pela AMPK, que regula processos catabólicos como a oxidação dos ácidos gordos e glicólise assim como processos anabólicos como a lipogénese (33). A ativação de AMPK aumenta em condições de excesso de nutrientes e na síndrome metabólica. Na regulação da via de sinalização adiponectina-AMPK, a proteína 13- α desempenha um papel importante. Esta proteína interatua com a *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), codificada pelo gene da proteína adaptadora, interação fosfotirosina, domínio PH e fecho de leucina 1 (APPL1). Esta proteína reguladora interfere na ligação do ligando ao recetor AdipoR1. Ao nível das células endoteliais, a adiponectina estimula a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) via AMPK, numa ação mediada pelos recetores AdipoR1/R2 (**Figura 3**) (34).

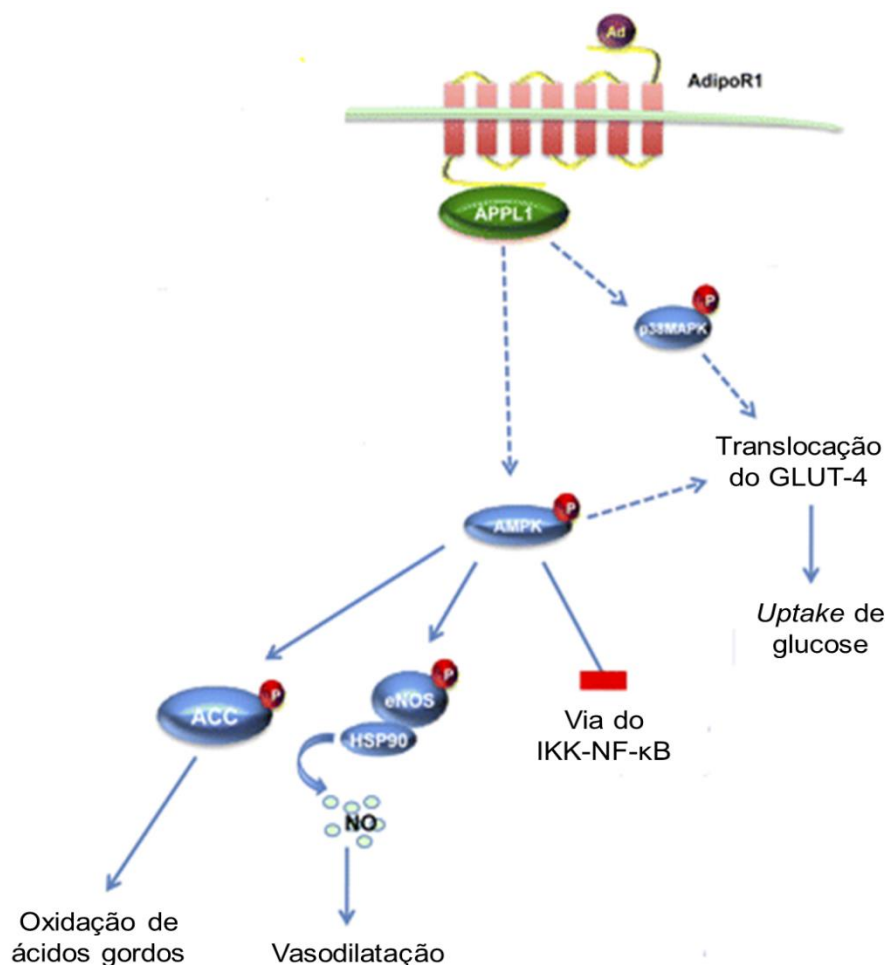


Figura 3- A adiponectina (Ad) liga ao terminal COOH extracelular do recetor de adiponectina 1 (AdipoR1) e recruta a APPL1 para o terminal NH₂ do AdipoR1 intracelular que ativa o AMPK e o p38 MAPK. O AMPK ativado fosforila e inativa a acetil-CoA carboxilase (ACC), resultando na oxidação dos ácidos gordos. O AMPK ativado fosforila também a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), levando à formação de proteínas de choque térmico (HSP90) e à produção de NO para mediar o efeito vasodilatador da adiponectina. A AMPK inibe a via do IKK/NF-κB. A ligação da adiponectina ao AdipoR1 estimula a translocação do transportador de glucose-4 (GLUT-4) e a absorção de glucose através da AMPK fosforilada e do p38 MAPK fosforilado (Adaptado de (34)).

Uma menor ativação destes recetores, devido à menor secreção de adiponectina, promove resistência à insulina e intolerância à glucose, um processo mediado pela via do NF-κB (**Figura 4**) (35).

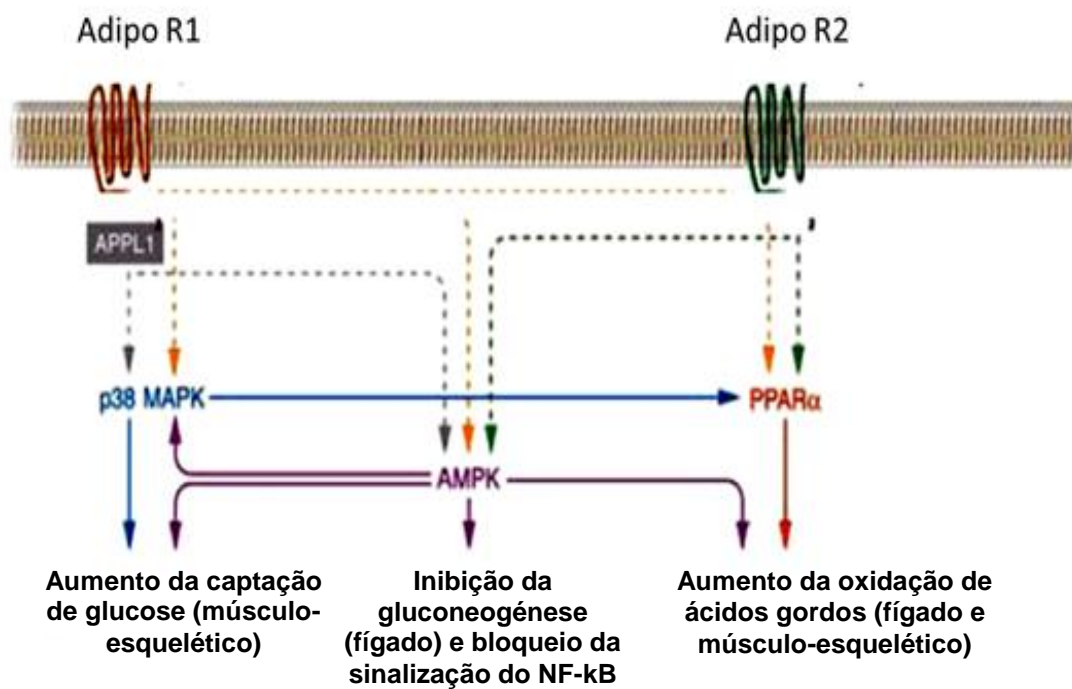


Figura 4- Mecanismo de ação da adiponectina (Adaptado de (52)).

Para além dos efeitos já referidos, a adiponectina reduz a expressão de IL-8 através da supressão da via do NF-κB (36). A diminuição dos níveis de adiponectina associada à obesidade compromete estas vias de sinalização com consequente deterioração da função endotelial (**Figura 5**), além de diminuir a sensibilidade à insulina (19).

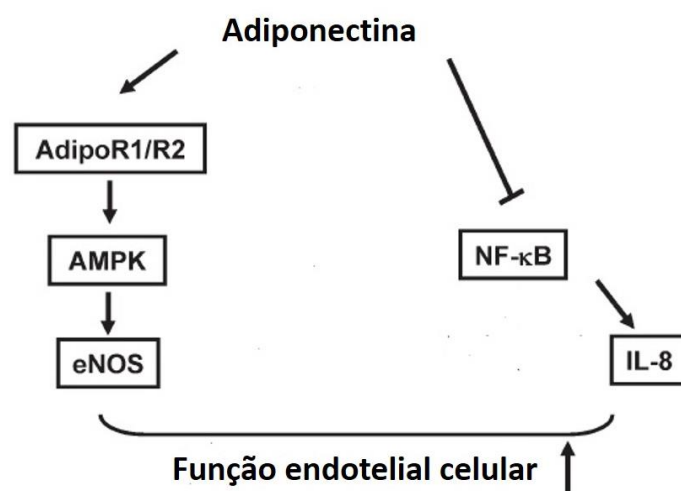


Figura 5- Efeitos da adiponectina sobre a função das células endoteliais (Adaptado de (36)).

A adiponectina tem sido sugerida como proteína terapêutica, podendo ser administrada como proteína recombinante (26), de forma a prevenir a disfunção endotelial, a hipertensão e a dislipidemia associada à obesidade (37).

1.2. O PAPEL DA LEPTINA NA OBESIDADE

A leptina é uma hormona de natureza proteica secretada pelos adipócitos e tem sido envolvida na regulação da massa corporal. Esta hormona atua no hipotálamo, promovendo o aumento da termogénese e a inibição do apetite, atua também no pâncreas reduzindo a secreção de insulina. A insulina é secretada pelas células β pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glucose, sendo a sua ação modulada por aminoácidos e ácidos gordos, além de estímulos neurais. Esta hormona atua em diferentes tecidos como o fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo, promovendo o aumento da captação de glucose, a síntese de proteínas, ácidos gordos e glicogénio. Assim, a insulina e a leptina participam num sistema de controlo endócrino com o objetivo de regular os níveis circulantes de glucose (38). Se por um lado a leptina inibe a secreção de insulina, a insulina estimula o aumento da expressão e secreção de leptina pelos adipócitos (39).

A leptina possui também uma ação vasoativa via ativação da eNOS e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Esta hormona promove ainda o aumento de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) oxidase nos adipócitos podendo este funcionar como ativador da via de sinalização Janus cinase/ transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT) pela produção de ROS (40). No hipotálamo, a via JAK-2/STAT-3 é controlada primeiro pela leptina, sendo ainda modulada pela insulina (41), via substrato do recetor de insulina (IRS) e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). Assim, o efeito da insulina provoca uma maior ativação do PI3K e influenciando o processo de controlo do apetite (42).

1.3. CONTRIBUIÇÃO DO STRESS OXIDATIVO PARA AS ALTERAÇÕES SISTÊMICAS ASSOCIADAS À OBESIDADE

O stress oxidativo também tem sido associado à patogénese da obesidade e complicações associadas (43). Este consiste num desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante e a produção de oxidantes, resultando num aumento da suscetibilidade das biomoléculas à lesão oxidativa (44). Em indivíduos obesos, o tecido adiposo é caracterizado pelo aumento de stress oxidativo que está associado à inflamação crónica de baixo grau (45). A produção aumentada de ROS está relacionada com o aumento sérico de lipoproteínas modificadas, particularmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) (44). A produção de ROS também aumenta no coração de indivíduos obesos, sendo maioritariamente formadas ao nível dos complexos I e III da fosforilação oxidativa mitocondrial (46). Este aumento do stress oxidativo no coração de indivíduos obesos tem sido também associado a uma redução da atividade da iNOS e ao aumento da atividade da xantina oxidase (47). Da ação da xantina oxidase, enzima envolvida no metabolismo de purinas, resulta a produção de ROS que promovem uma disfunção endotelial em indivíduos com doença coronária e disfunção contrátil associada a insuficiência cardíaca (47). O desequilíbrio entre o NO endotelial e a produção de ROS é uma das principais causas da disfunção endotelial, sendo estes importantes na patogénese da aterosclerose e doença cardíaca (48). Adicionalmente, a produção de TNF- α ao nível dos adipócitos, através da estimulação da ativação da NADPH oxidase, parece comprometer a sinalização da insulina, inibindo o transporte de glucose e promovendo a resistência à insulina (49,50). Assim, tanto o TNF- α como as ROS agem diretamente sobre os adipócitos para regular a expressão da apolipoproteína E (apoE), via NF- κ B, contribuindo para a expressão de apoE nos adipócitos de indivíduos obesos. Esta interação entre o pró-oxidante e o pró-inflamatório sugere que intervenções que reduzam a inflamação e o stress oxidativo ao nível do tecido adiposo irão modular a expressão de apoE nos adipócitos (45).

1.4. IMPACTO DA OBESIDADE NA HOMEOSTASIA CARDIOVASCULAR

O conjunto das doenças cardiovasculares representadas pela hipertensão arterial, aterosclerose, doença cerebrovascular e suas complicações constituem a principal causa de morte precoce na idade adulta em indivíduos obesos. Segundo estudos recentes, entre os indivíduos com 40 anos de idade, sem queixas relacionadas com o sistema cardiovascular, 50% dos homens e 33% das mulheres apresentam alguma manifestação da doença da artéria coronária, como angina de peito, insuficiência coronária ou enfarte do miocárdio (12).

Os fatores de risco associados a doenças cardiovasculares atuam precocemente na vida e têm um impacto importante principalmente sobre o desenvolvimento de aterosclerose. A aterosclerose tem uma longa fase pré-clínica, com o desenvolvimento de alterações patológicas nas artérias de crianças e adultos jovens, bem antes das manifestações clínicas da doença que se manifestam nos adultos. Existe assim uma relação entre a extensão das lesões ateroscleróticas precoces em crianças e os níveis de lípidos no sangue (51). Os lípidos e as lipoproteínas têm assim um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares incluindo a aterosclerose. Durante muito tempo, a fisiopatologia da aterosclerose era explicada meramente pela acumulação de lípidos na parede arterial. Assim, as LDL quando oxidadas (LDL-ox) são capturadas por macrófagos na parede dos vasos formando células espumosas com colesterol, que participam na formação do ateroma levando à aterosclerose (44). No entanto, nas últimas duas décadas, tem sido sugerido que as lesões ateroscleróticas advêm de uma série de eventos celulares e moleculares altamente específicos e dinâmicos, com uma forte componente inflamatória (52). A obesidade ao comprometer a função do endotélio e ao estimular uma reação inflamatória/proliferativa na parede vascular favorece a aterosclerose (14). O aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o TNF- α , está associado ao aumento da expressão de moléculas de adesão leucocitária, tais como as moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e selectinas do tipo P, E e L, de proteínas quimiotáticas de monócitos-1 (MCP-1) e do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), com consequente amplificação da cascata inflamatória (28). O aumento da permeabilidade do endotélio, a infiltração lipídica e a formação de placas de tecido adiposo nas camadas íntima e média das paredes arteriais

são seguidas por uma complexa sequência de eventos envolvendo plaquetas, macrófagos, células musculares lisas e fatores de crescimento, com a adesão de monócitos ativados à parede endotelial e fagocitose de partículas de LDL-ox. Estas disfunções originam o aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e formação de células espumosas, que também produzem TNF- α , induzindo a formação de coágulos e a ocorrência de síndrome coronária aguda (12). Na **Figura 6** encontram-se resumidos os mecanismos associados à doença cardiovascular e à obesidade, dando ênfase aos biomarcadores de obesidade que podem atuar como fatores de risco de doenças cardiovasculares e que podem ter impacto na função do tecido adiposo (53).

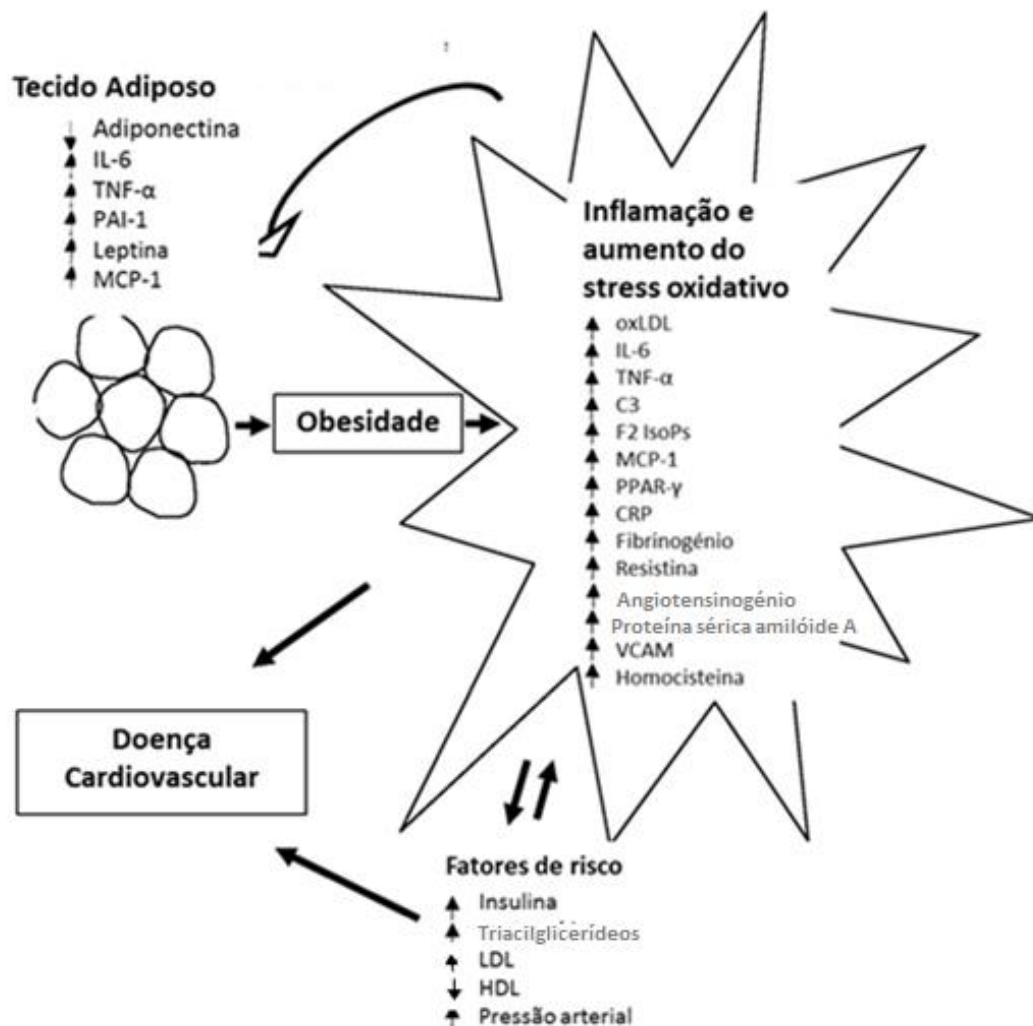


Figura 6- Mecanismos associados à interação entre doença cardiovascular e obesidade (Adaptado de (53)).

2. EXERCÍCIO FÍSICO COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA/ PREVENTIVA DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES E DA OBESIDADE

A prática de exercício físico tem sido indicada para o controlo da obesidade, dado que reduz a gordura corporal e aumenta o consumo energético, mesmo em repouso (54). Assim, a atividade física tem um impacto benéfico sobre o sistema cardiovascular, tanto diretamente, melhorando a função endotelial e indiretamente através da normalização de fatores de risco da aterosclerose, como a dislipidemia, a hipertensão arterial e a obesidade. Entre os vários efeitos benéficos promovidos pela prática regular de atividade física tem sido referido o aumento do fluxo sanguíneo, a redução da pressão arterial, a diminuição da frequência cardíaca basal, a diminuição dos níveis de LDL, o aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), o aumento da sensibilidade à insulina, o aumento da atividade antioxidante e da capacidade de oxigenação muscular, reduzindo o risco de doença cardiovascular e melhorando o estado funcional em pacientes com doença cardiovascular bem como o aumento da capacidade física (55). Os benefícios cardiovasculares que advêm da prática de exercício físico são multifatoriais, e incluem efeitos sistémicos importantes com impacto no músculo-esquelético, na vasculatura periférica e no metabolismo, assim como alterações benéficas no próprio miocárdio. Assim, o exercício físico promove o aumento do débito cardíaco, aumenta a proteção contra o dano isquémico, e modula o metabolismo cardíaco e o suprimento vascular (**Figura 7**) (56). Esta proteção contra as doenças cardiovasculares, mais particularmente contra danos no miocárdio parece ser mediada, pelo menos em parte, pela enzima eNOS que produz o agente vasodilatador do endotélio NO, aumentando o diâmetro estrutural dos vasos e diminuindo a pressão arterial, mantendo assim a homeostasia vascular (57).

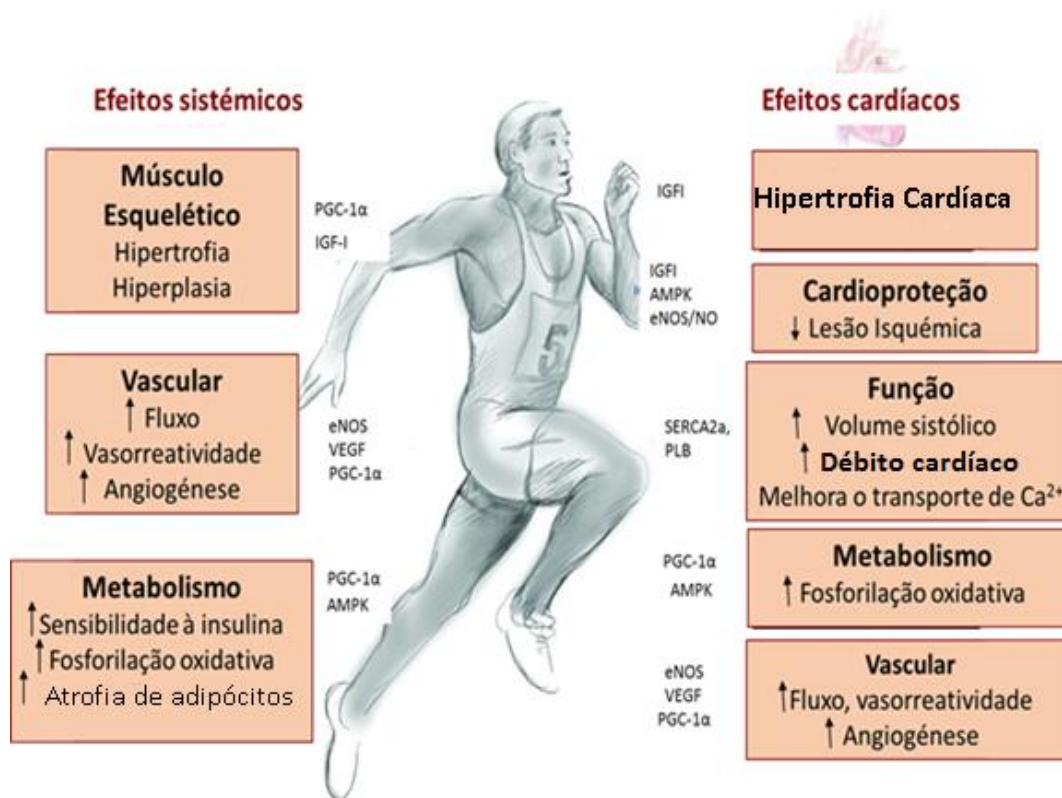


Figura 7- Mecanismos associados aos efeitos sistêmicos e cardíacos induzidos pela prática regular de exercício físico. IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; PGC-1 α : Peroxissoma ativado pelo proliferador do recetor gama co-ativador 1-alfa; PLB: fosfolamban; SERCA2a: sarco/retículo endoplasmático Ca²⁺- ATPase, 2a (Adaptado de (56)).

O aumento dos níveis de TG no sangue após uma refeição é menor se for realizado exercício físico cerca de 18 horas antes, devido ao aumento da atividade da lipoproteína lipase que hidrolisa os TG (58). O exercício físico potencia ainda a captação da glucose pelas fibras musculares esqueléticas (59) por estimular a translocação do transportador de glucose-4 (GLUT-4) para o sarcolema de forma independente da insulina (60). Este efeito em conjunto com o aumento da sensibilidade à insulina induzido pelo exercício físico parece conferir proteção contra a obesidade. O exercício físico promove ainda a redução dos níveis plasmáticos de adipocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6, da proteína de fase aguda PCR, do PAI-1 e do angiotensinogénio, bem como de marcadores periféricos da disfunção endotelial como as moléculas de adesão molecular (CAMs) e vascular (VCAMs), a expressão de NADPH oxidase e da enzima iNOS no músculo-esquelético, aumentando a atividade da citocromo c oxidase e melhorando o metabolismo

oxidativo muscular (61–63). Por outro lado, o exercício físico aumenta os níveis plasmáticos da adiponectina e das adipocinas anti-inflamatórias interleucina-4 (IL-4) e IL-10 que vão atuar no sistema imunitário, influenciando a função de macrófagos e linfócitos (64–66). O exercício físico de intensidade leve a moderada induz ainda um aumento das defesas antioxidantes em vários órgãos, contribuindo para o equilíbrio fisiológico oxidante/antioxidante (67). Também o exercício físico tem a capacidade de aumentar a expressão de canais K_{ATP} e de otimizar o consumo de energia sob condições de maior exigência funcional. Este aumento induzido pelo exercício físico é essencial na cardioproteção, visto que a abertura de apenas 1% de canais de K_{ATP} é suficiente para causar alteração significativa no fluxo e pressão sanguínea (68,69). No entanto, a quantidade de atividade física necessária para a obtenção destes efeitos benéficos é variável e difícil de definir. De acordo com a *American Heart Association*, a prática de 30 minutos de exercício físico durante cinco dias por semana melhora a funcionalidade do coração e reduz o risco de doença cardiovascular, mas esta tem de ser permanente para ter esses efeitos positivos sobre o sistema cardiovascular (70). A OMS aconselha a que as crianças pratiquem uma hora por dia de atividade física moderada a vigorosa (71). Dados mostram uma diminuição da taxa de mortalidade em 20-25% após enfarte de miocárdio em pacientes submetidos a um programa de exercício de reabilitação. Demonstrou-se também que o exercício físico em quantidades controladas diminui o risco relativo de mortalidade em 35% e de hospitalização em 28% em indivíduos com insuficiência cardíaca crónica. O exercício físico é benéfico para todas as formas de insuficiência cardíaca em termos de diminuição da mortalidade e melhoria da massa muscular e estado físico (72).

2.1. MECANISMOS MOLECULARES MODULADOS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR PELO EXERCÍCIO FÍSICO

A prática regular de atividade física promove adaptações cardiovasculares que ocorrem em resposta às alterações hemodinâmicas e às condições de sobrecarga cardíaca promovidas pelo exercício físico. As alterações estruturais, resultantes do exercício físico, dependem da natureza, duração e intensidade do exercício. As diversas modalidades desportivas têm sido classificadas, fundamentalmente, em dois tipos principais: exercício

de *endurance*, isto é, exercício de baixa tensão mecânica e de longa duração, e exercício de resistência, isto é, de elevada tensão mecânica e de curta duração (73). Estas modalidades promovem adaptações moleculares diferentes ao nível do sistema cardiovascular. O exercício físico de baixa tensão mecânica e de longa duração é o tem sido mais estudado no contexto da adaptação cardiovascular ao exercício físico. Este tipo de exercício consiste em atividades como correr, andar de bicicleta e nadar, que melhoram a funcionalidade do sistema cardiovascular e aumentam a capacidade do organismo em utilizar o oxigénio. O treino de *endurance* induz adaptações cardiovasculares centrais que incluem o aumento do volume sistólico do coração, redução da viscosidade do sangue e aumento do débito cardíaco (73). Neste sentido, o exercício de *endurance* tem sido indicado como abordagem terapêutica a doentes com insuficiência cardíaca (74).

Entre os vários efeitos celulares promovidos por este tipo de atividade física é de salientar o aumento da eficiência dos sistemas de defesa antioxidante, bem como a regulação do estado *redox* da célula. O treino físico induz um aumento da produção de ROS que ativam eventos intracelulares, nomeadamente a via de sinalização do NF- κ B, que culminam no aumento da expressão de enzimas antioxidantes (75). O exercício físico retarda a acumulação de danos nas células mediados pelos ROS pelo aumento da expressão e funcionalidade das defesas antioxidantes e/ou da redução da produção de compostos pró-oxidantes pela fosforilação oxidativa (76,77). Mas, em grande parte, a cardioproteção deve-se ao aumento da expressão de importantes enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), a glutathione peroxidase e a catalase (76,78). Assim, a realização de treino de *endurance* num curto espaço de tempo (dias), bem como num longo espaço de tempo (semanas a meses), promove um acréscimo da capacidade antioxidante do miocárdio (65,78). Mais ainda, uma série de eventos associados ao exercício físico, incluindo o stress térmico e hipoxia, a redução do pH intracelular, a depleção das reservas de glicogénio, o aumento dos níveis de cálcio citosólico parece contribuir para a elevação dos níveis de proteínas de choque térmico (HSPs) no músculo cardíaco. O aumento da expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) em cardiomiócitos tem sido associada a proteção contra danos isquémicos (65).

A mitocôndria tem um papel fundamental na adaptação do músculo cardíaco promovida pelo exercício físico. Estudos salientaram o aumento do número e tamanho

das mitocôndrias em resposta à atividade física (75,79,80). A adaptação das mitocôndrias do coração ao exercício físico tem sido associada a um aumento do metabolismo de hidratos de carbono e da síntese proteica. A alteração na utilização do substrato energético de ácidos gordos para glucose parece estar relacionada com uma maior eficiência energética. Os níveis de p38 proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK) aumentam nas mitocôndrias quando é realizado exercício físico ao longo da vida levando à fosforilação de proteínas, tais como a proteína cinase ativada por mitogénio 2 (MAPK2), o fator de transcrição 2 ativado, o fator potenciador de miócitos (MEF) e os fatores de regulação pós-transcrição como a tristetraprolina (TTP) (80–82). Além disso, a ativação de AMPK pelo exercício físico também leva a um aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) o que contribui para um aumento do número de células endoteliais, levando à angiogénese (73).

O treino de *endurance* aumenta também a síntese proteica no músculo cardíaco bem como o transporte de glucose via GLUT-4 estimulado pela insulina no coração, criando um equilíbrio glicémico em repouso (83). Este tipo de treino também pode diminuir o índice de adiposidade visceral e o tamanho dos adipócitos de forma controlada, o que conduz a uma diminuição das concentrações séricas de leptina (84).

3. BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES ASSOCIADAS À OBESIDADE

A avaliação do risco de doenças cardiovasculares envolve a análise de biomarcadores no soro ou no plasma, incluindo o colesterol total (CT), TG, colesterol LDL, colesterol HDL, insulina e o peptídeo C. No caso de dislipidémia há um aumento da produção de TG e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade, bem como a redução de HDL e o aumento da densidade de LDL. A hipertrigliceridemia está associada a predominância de pequenas partículas densas de LDL, devido à diminuição relativa de colesterol não esterificado, colesterol esterificado e fosfolípidos, não havendo nenhuma mudança ou aumento dos níveis de LDL. As pequenas partículas de LDL são mais tóxicas para o endotélio pois podem atravessar a membrana basal endotelial facilmente, aderem bem a glucosaminoglicanas, são mais suscetíveis à oxidação e são mais seletivas para os

recetores *scavenger* de macrófagos (25). Uma elevada pressão arterial é considerada como um fator preditor independente da elasticidade arterial em adultos jovens e contribui para acelerar a aterosclerose, levando ao aumento da rigidez arterial. O aumento do risco de pressão arterial elevada, as concentrações elevadas de CT, colesterol LDL e TG, e uma baixa concentração de colesterol HDL foi verificado em crianças e adolescentes com excesso de peso, levando a um maior risco de doenças cardiovasculares (85).

Os indivíduos obesos apresentam níveis elevados de PCR, e de outros marcadores de inflamação cardíaca, tais como o rácio ferritina/saturação de transferrina (F/T) e o número absoluto de neutrófilos (ANC). Estes marcadores encontram-se especialmente elevados quando existe risco de doenças cardiovasculares mediado pela adiposidade central. Os níveis elevados de F/T começam por ser detetados por volta dos 6 anos de idade e os níveis elevados de ANC a partir dos 9 anos. Aproximadamente 42% das crianças obesas com idades entre os 3 e os 5 anos apresentam níveis elevados de PCR, em comparação com 17% das crianças com peso normal. Estas diferenças aumentam para cerca de 83% em adolescentes obesos com 15 a 17 anos de idade (86). O aumento dos níveis de PCR tem sido associado a condições inflamatórias crónicas, como a aterosclerose, e os seus níveis triplicam quando há risco de doenças vasculares periféricas. Neste sentido, a PCR tem sido sugerida como biomarcador de doenças cardiovasculares em indivíduos obesos (87). Visto que a IL-6 é produzida no tecido adiposo abdominal e é, por sua vez, um indutor da produção de PCR pelo fígado existe uma relação de influência entre diversos fatores de risco da doença aterosclerótica. Este risco tende a diminuir com a redução dos níveis de PCR, com consequente perda de peso corporal ou através da realização de exercício físico (88). A PCR para além de ser considerada um biomarcador de aterosclerose, tem sido envolvida na patogénese desta doença por mediar vários mecanismos como: inibir a transcrição da eNOS; promover a captação de colesterol pelos macrófagos; estimular os monócitos a produzir o fator tecidual e citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) via NF- κ B (89). A PCR também estimula a expressão e a atividade do PAI-1 em células endoteliais, pelo que indivíduos com níveis elevados de PCR também apresentam valores elevados de PAI-1. Tal como o PAI-1, o fibrinogénio e a IL-6 encontram-se em níveis elevados na presença de doença cardiovascular. Assim, tem sido sugerido que níveis elevados de IL-6 permitem prever eventos cardiovasculares (90). O TNF- α encontra-se em níveis elevados no sangue de pacientes com doença

isquêmica cardíaca crônica, sobretudo 48 horas após o início dos sintomas (91). A proteína de fase aguda SAA complementa o valor preditivo da PCR na avaliação do risco de eventos cardiovasculares (89). Os níveis da mieloperoxidase (MPO) também já foram associados ao risco de eventos cardiovasculares adversos, tais como enfarte agudo do miocárdio ou morte, num período de tempo entre 30 dias e seis meses após a elevação dos seus níveis (92).

Uma adipocina que se encontra elevada em indivíduos obesos e é expressa nos adipócitos é a resistina, estando indiretamente relacionada com a regulação nutricional e com a manutenção dos níveis de glucose no sangue em jejum. Este marcador inflamatório é responsável ainda pelo aumento da expressão da endotelina-1, de várias moléculas de adesão e quimiocinas (12,93). A resistina foi positivamente associada a hipertensão e a valores elevados de TG e negativamente associada aos níveis de HDL. Níveis elevados de homocisteína (Hcys), uma molécula associada à ativação endotelial, constituem um fator de risco de doença cardiovascular. Estas alterações plasmáticas de Hcys estão associadas ao aumento da expressão de resistina no tecido adiposo e a secreção de hormonas nos adipócitos, estando esta relacionada com o aumento da adiposidade visceral. Um aumento na concentração de resistina diminui significativamente a expressão da enzima eNOS sugerindo que os efeitos da resistina podem ser mediados pelo stress oxidativo. Assim, a resistina pode atuar como molécula efetora que conduz a um estado aterosclerótico, tendo efeitos diretos sobre a ativação de células endoteliais através da indução da expressão de moléculas de adesão de células, promovendo a adesão de leucócitos (94). A resistina foi também associada a mediadores inflamatórios, assim como à calcificação coronária (53). Os mediadores inflamatórios associados à obesidade têm um efeito sobre a estrutura e, consequentemente, função endotelial vascular. Assim, a resistência à insulina e a disfunção endotelial têm em comum a libertação de mediadores inflamatórios a partir do tecido adiposo (95).

O peptídeo natriurético tipo B (BNP) é um dos principais biomarcadores de prognóstico de eventos cardiovasculares. Esta neurohormona é sintetizada no ventrículo cardíaco, sendo libertada na circulação em resposta à dilatação ventricular e sobrecarga na parede do miocárdio na ausência de necrose, isto no caso de doenças cardiovasculares em que haja uma patologia estrutural do miocárdio. Embora a obesidade esteja associada

a condições que geram esse tipo de sobrecarga, estudos prévios mostraram níveis reduzidos de BNP em indivíduos obesos comparativamente a indivíduos magros (96).

III. OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado teve como objetivo principal avaliar o papel do exercício físico na obesidade. Nesse sentido, utilizou-se um modelo animal de ratos ZSF1 magros e obesos, em que um grupo de animais obesos foi submetido a um protocolo de exercício físico em tapete rolante, com o intuito de:

- i) Avaliar o efeito da obesidade e do exercício físico no perfil plasmático de hormonas associadas à regulação do metabolismo do tecido adiposo e controlo do apetite tais como a adiponectina, grelina e leptina;
- ii) Avaliar o efeito da obesidade e do exercício físico no perfil inflamatório pela análise de marcadores plasmáticos como a PCR, a IL-6, o TWEAK, e a HSL;
- iii) Avaliar o efeito da obesidade e do exercício físico a partir da análise de marcadores de stress oxidativo (proteínas nitradas) e da irisina.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. PROTOCOLO ANIMAL

De forma a atingir os objetivos propostos para o presente trabalho de dissertação, implementou-se um protocolo animal com ratos macho ZSF1 magros (ZSF1 Lean, n=6) e ZSF1 obesos (ZSF1 Obese, n=10), adquiridos à Charles River (Barcelona, Espanha) com 9 semanas de idade. O modelo animal ZSF1 Obese (Charles River) resulta do cruzamento entre uma fêmea ZDF e um macho SHHF e caracteriza-se por ser obeso, apresentar intolerância à glucose, resistência à insulina, hiperglicemia e glicosúria, consistente com diabetes *mellitus* tipo 2 e síndrome metabólico (97).

Os animais foram colocados em gaiolas (2 por gaiola) com acesso livre a água e comida (LabDiet® 5008, International Product Supplied Ltd) e foram mantidos em condições controladas de temperatura ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), de humidade ($60\pm 5\%$) e de luminosidade (ciclos de 12 h de luz/escuro). Às 14 semanas de idade, 5 dos animais ZSF1 obesos foram submetidos a um protocolo de exercício físico em tapete rolante, isto após uma semana de aclimatização. Estes animais treinaram 1 h por dia, 5 dias/semana a 15 m/min durante 4 semanas. A atividade física dos restantes animais foi limitada ao espaço da gaiola. No final do protocolo experimental, os animais foram pesados e posteriormente anestesiados para avaliação da função cardíaca. No final extraiu-se sangue por punção cardíaca para obtenção de plasma para a determinação de parâmetros bioquímicos. O coração e o músculo *gastrocnemius* foram retirados, pesados e guardados para posteriores análises.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as especificações e recomendações do *Guide for Care and Use of Laboratory Animal* do *Institute for Laboratory Animal Research* (ILAR, 2011) e após aprovação da Comissão local de acordo com a Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro, e com os regulamentos da Legislação da Comunidade Europeia para o Bem-estar Animal.

2. DOSEAMENTO DA PROTEÍNA TOTAL

A concentração de proteína total nas amostras de plasma foi determinada utilizando o método comercial DC *assay* (Bio-Rad) que se baseia no protocolo de Lowry, permitindo quantificar a proteína total na presença de detergentes. O método de Lowry é utilizado com concentrações de proteína de 0,01-1,0 mg/mL. Utilizaram-se soluções de albumina sérica bovina (BSA) para realização de uma curva padrão. Os padrões de BSA e as amostras foram analisadas simultaneamente. O procedimento experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, tendo-se no final lido as absorvências do complexo azul formado a 750 nm num leitor para microplacas (Tecan® Infinite M200).

3. DOSEAMENTO DE COLESTEROL TOTAL E DE TRIACILGLICERÍDEOS

Para a determinação da concentração de CT e de TG nas amostras de plasma utilizaram-se kit comerciais (Cormay). O doseamento do CT baseia-se num método enzimático e colorimétrico que consiste na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase formando colesterol livre que após oxidação pela colesterol oxidase forma peróxido de hidrogénio e este reage com o fenol e a 4-aminoantipirina, com formação de um composto cromogénico, a quinoneimina de cor vermelha.

No caso do doseamento dos TG, o procedimento é baseado num método colorimétrico e enzimático que consiste na hidrólise enzimática dos TG em glicerol e ácidos gordos livres por ação da lipoproteína lípase. O glicerol é fosforilado pela glicerol-cinase na presença de ATP formando-se glicerol-3-fosfato e adenosina difosfato (ADP). De seguida, o glicerol-3-fosfato é oxidado pelo glicerofosfato oxidase formando-se di-hidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogénio que reage com o *N*-etil-*N*- sulfopropil-*N*-anisidina (ADPS) e a 4-aminoantipirina, com formação de quinoneimina de cor vermelha.

Após incubação das amostras, do branco e dos respetivos padrões a 37°C com os reagentes cromogénicos específicos, durante 5 minutos, mediu-se a absorvência a 500 nm,

no doseamento de CT, e a 550 nm no doseamento de TG, calculando-se as respectivas concentrações a partir das absorvências.

4. IMMUNOBLOTTING

Foram utilizadas amostras de plasma de animais magros (ZSF1 *Lean*, n=6), de animais obesos (ZSF1 *Ob*, n=5) e de animais obesos que posteriormente foram submetidos a exercício físico (ZSF1 *Ob + Ex*, n=5). A análise semi-quantitativa da adiponectina, leptina, PCR, grelina, irisina, IL-6, TWEAK, proteínas nitradas e HSL (lípase sensível a hormona) no plasma foi realizada usando o método de slot blot. Para o efeito, as amostras de plasma foram diluídas 1:25 ou 1:50, dependendo do parâmetro analisado, em TBS (tampão de 100 mM de Tris, pH de 8,0, com 1,5 mM de NaCl) e foi aplicado, sob vácuo, um volume de 100 µL numa membrana de nitrocelulose (Whatman®, Protan®). A eficiência da transferência de proteína para a membrana foi confirmada por coloração da membrana com Ponceau S. Tendo em consideração a elevada concentração de TG no soro dos animais obesos e que interferiu na análise de alguns parâmetros, procedeu-se à precipitação da proteína total do plasma. Assim, adicionou-se 10 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v) a 10 µL de amostra e após 30 minutos no gelo, procedeu-se à centrifugação a 14000xg durante 30 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. De seguida adicionou-se 60 µL de acetona gelada, centrifugou-se novamente a 14000xg, durante 30 minutos a 4°C e voltou-se a descartar o sobrenadante. Deixou-se secar o *pellet* à temperatura ambiente e depois suspendeu-se em TBS.

As membranas foram posteriormente incubadas em uma solução de leite magro em pó 5% (m/v), preparada em TBS-T (tampão TBS com 0,5% de Tween 20), durante 1 h, à temperatura ambiente e com agitação, de modo a bloquear os locais de ligação não específicos. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário respetivo para as proteínas analisadas (anti-adiponectina, *mouse* monoclonal, ab22554, Abcam; anti-leptina, *rabbit* monoclonal, ab16227, Abcam; anti-PCR *rabbit* monoclonal, ab65842, Abcam; anti-grelina *rabbit* monoclonal, ab64325, Abcam; anti-irisina *rabbit* monoclonal, ab174833, Abcam; anti-TWEAK *rabbit* monoclonal, ab371701, Abcam; anti-IL-6 *rabbit* monoclonal, ab6672; Abcam; anti-3-nitrotirosina *mouse* monoclonal, MAB5404,

Chemicon; anti-HSL, *rabbit* policlonal, ab45422, Abcam) durante duas horas à temperatura ambiente e com agitação. Os anticorpos foram diluídos 1:1000 numa solução de 5% de leite magro em pó em TBS-T. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T três vezes durante 10 minutos com o intuito de retirar o anticorpo não ligado covalentemente e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário (anti-*rabbit* ou anti-*mouse*, NA934 ou NA931; GE *Healthcare Life Sciences*), diluído 1:1000 numa solução de 5% leite magro em pó em TBS-T, durante 1 h com agitação à temperatura ambiente. Após três lavagens com TBS-T, durante 10 minutos cada, as membranas foram tratadas com reagentes de quimioluminescência (reagentes ECL-Plus; Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante, e expostas a um filme de raio X (Kodak Biomax Light Film, Sigma), que após revelação, foram digitalizados num Molecular Imager Gel Doc XR+ System (BioRad) e analisados com o *software* QuantityOne versão 4.6.3 (BioRad) e posteriormente com o *software* ImageLab versão 5.2.1. (BioRad).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis analisadas apresentaram uma distribuição normal. Por essa razão, todos os resultados deste trabalho foram processados recorrendo aos testes estatísticos paramétricos. A média e o desvio padrão foram calculados para todas as variáveis de cada um dos grupos experimentais. Para testar as diferenças entre estes grupos experimentais efetuou-se uma análise de variância multifatorial *one-way ANOVA* seguida da aplicação do teste *Tukey post-hoc* de comparação múltipla.

Os cálculos foram efetuados com o *software* GraphPad Prism versão 5.0. O nível de significância estabelecido foi de 5 % (p-value <0,05).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ESTUDO DO IMPACTO DO EXERCÍCIO FÍSICO NOS ANIMAIS OBESOS

1.1. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANTROPO- E MORFOMÉTRICOS

A análise do peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais evidenciou valores significativamente mais elevados, em 37%, nos animais obesos comparativamente com os animais magros ($p < 0,001$ vs *Lean*; **Tabela 1**). Quatro semanas de exercício físico não promoveram alterações significativas do peso corporal (**Tabela 1**). Na análise comparativa da relação entre a massa do coração e o peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais observaram-se valores 18% mais baixos nos animais obesos sedentários ($p < 0,01$ vs *Lean*) e também valores 15% mais baixos nos animais obesos sujeitos a exercício físico ($p < 0,05$ vs *Lean*; **Tabela 1**). Estas diferenças deveram-se sobretudo às grandes diferenças de peso corporal (relativamente ao grupo *Lean*) e não por redução da massa do coração. No entanto, na análise da massa do coração dos animais obesos treinados verificaram-se valores estatisticamente mais elevados, em cerca de 20%, comparativamente aos animais magros ($p < 0,05$ vs *Lean*; **Tabela 1**). Estudos anteriores suportam o aumento da massa do coração em indivíduos humanos obesos após a prática de exercício físico moderado (98,99), tal como verificado no presente estudo, embora não estatisticamente significativo. É de salientar que este aumento de massa do coração, sugestiva de hipertrofia, promovido pelo exercício físico foi acompanhado por um efeito protetor ao nível da função cardíaca (prevenção da disfunção diastólica e do aumento da rigidez do miocárdio induzida pela obesidade) (resultados não apresentados).

O efeito do exercício físico não foi evidente quando se analisou a massa de um músculo-esquelético, o *gastrocnemius* (**Tabela 1**), um músculo recrutado aquando da realização de atividade física (100). Num estudo anterior foi demonstrado um aumento da massa do *gastrocnemius* em ratos sedentários após a realização de exercício físico, embora neste estudo em particular o exercício físico de *endurance* ter sido realizado

durante 35 semanas (101). Assim sendo, o aumento da massa do *gastrocnemius* poderá estar dependente de grande volume de treino.

Tabela 1 – Caracterização dos grupos experimentais em termos de peso corporal, massa de coração e de massa do *gastrocnemius* (n= número de ratos em estudo).

Parâmetros avaliados	Grupos Experimentais	<i>Lean</i> (n=6)	<i>Ob</i> (n=5)	<i>Ob+Ex</i> (n=5)
Peso corporal (g)		453,13±48,03	621,96±40,81***	620,94±33,93***
Massa do coração (g)		1,47±0,22	1,69±0,20	1,76±0,14*
Massa do <i>Gastrocnemius</i> (g)		2,30±0,64	2,25±0,71	2,20±0,10
Massa do coração/peso corporal		0,0033±0,0004	0,0027±0,0002**	0,0028±0,0001*

Os valores estão apresentados como média±desvio padrão.

(* p <0,05 vs *Lean*; ** p <0,01 vs *Lean*; *** p <0,001 vs *Lean*)

1.2. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA OBESIDADE E DA ATIVIDADE FÍSICA NO METABOLISMO E PROTEÍNAS REGULADORAS DO APETITE

Os animais obesos evidenciaram níveis significativamente mais elevados de TG, em cerca de 8 vezes, e de CT, em aproximadamente 5 vezes, do que os animais magros (p <0,001 e p <0,01 vs *Lean*, respetivamente), o que está de acordo com a literatura (102,103). O exercício físico não modulou significativamente os níveis plasmáticos de CT, à semelhança do verificado anteriormente (104). O efeito benéfico do exercício físico parece verificar-se sobre o nível de colesterol HDL e TG (104,105). Segundo alguns autores, os níveis plasmáticos de lípidos e lipoproteínas só são modulados pela atividade física quando esta tem a duração mínima de pelo menos 40 minutos por dia, 5 dias por semana durante 4 meses (106). Ao nível da proteína total, não se verificaram alterações significativas entre os grupos experimentais (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nas concentrações de proteína total, colesterol total e triacilglicerídeos no plasma dos animais dos grupos *Lean*, *Ob* e *Ob+Ex* (n= número de ratos em estudo).

Parâmetros avaliados \ Grupos Experimentais	<i>Lean</i> (n=6)	<i>Ob</i> (n=5)	<i>Ob+Ex</i> (n=5)
Proteína total (mg/mL)	77,19±23,66	73,66±1,11	91,70±17,73
Colesterol total (mg/dL)	41,67±3,96	200,00±80,94**	202,44±101,06**
Triacilglicerídeos (mg/dL)	76,65±24,42	629,66±177,63***	793,71±174,27***

Os valores estão apresentados como média±desvio padrão.

(** p <0,01 vs *Lean*; *** p <0,001 vs *Lean*)

A análise das três hormonas que regulam o metabolismo do tecido adiposo, a adiponectina, a grelina e leptina evidenciaram diferenças entre os grupos experimentais. Na avaliação dos níveis de adiponectina observaram-se níveis plasmáticos significativamente mais baixos em animais obesos comparativamente aos magros (p <0,01 vs *Lean*; **Figura 8**). Uma correlação negativa entre a obesidade e os níveis circulantes de adiponectina já foi demonstrada previamente, bem como a associação entre baixos níveis desta hormona e a resistência à insulina (107). Assim, os resultados obtidos vão de encontro com o descrito na literatura, visto que os níveis de adiponectina se encontram baixos em obesos, comparativamente a indivíduos magros. Os resultados obtidos neste estudo mostram ainda que o exercício físico não influenciou os níveis de adiponectina observados nos obesos, ao contrário do descrito em estudos anteriores (108,109). No entanto, as diferenças entre os resultados obtidos no presente estudo e outros anteriores podem ser justificados pela duração do protocolo de exercício e pela sua intensidade (110). O fato de o exercício físico não ter aparentemente modulado o teor de TG do plasma nem o peso corporal poderá suportar o perfil de adiponectina observado nos animais obesos treinados.

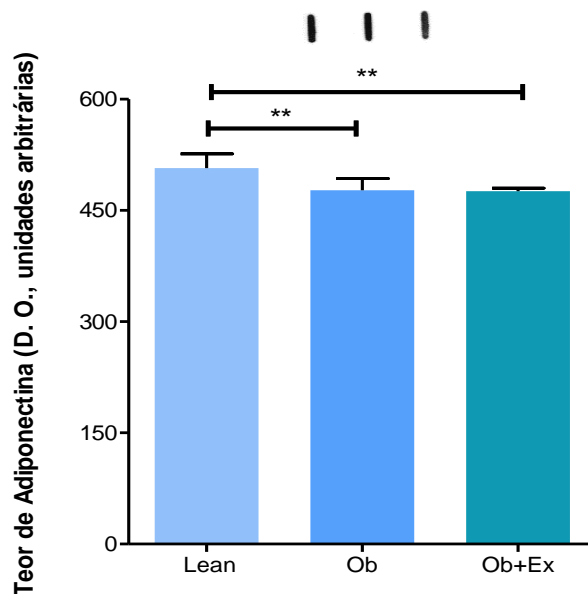


Figura 8- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de adiponectina avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico correspondente. Os valores são expressos como média±desvio padrão (** $p < 0,01$ vs *Lean*).

Na determinação dos níveis de grelina verificou-se, a nível experimental, que o teor de lípidos influenciou a interação anticorpo-antigénio pelo que se procedeu à precipitação da proteína total das amostras de plasma para a subsequente determinação dos níveis plasmáticos de grelina. Essa análise evidenciou níveis 10% significativamente mais baixos em animais obesos comparativamente aos magros ($p < 0,05$ vs *Lean*; **Figura 9**), à semelhança do verificado anteriormente (*III*). Estes níveis diminuídos de grelina na obesidade podem ser devido a elevados níveis de insulina e leptina, uma vez que em jejum os níveis de grelina plasmática se correlacionam negativamente com os níveis plasmáticos de insulina e leptina (*III, III2*). O exercício físico influenciou esta tendência, embora de forma não estatisticamente significativa (**Figura 9**), à semelhança do verificado anteriormente. A razão para a não alteração dos níveis de grelina após exercício físico ainda não é clara, pois ainda não se conhece qual ou quais seriam os mecanismos de controlo neuro-hormonal da secreção de grelina regulados pela atividade física (*III3*).

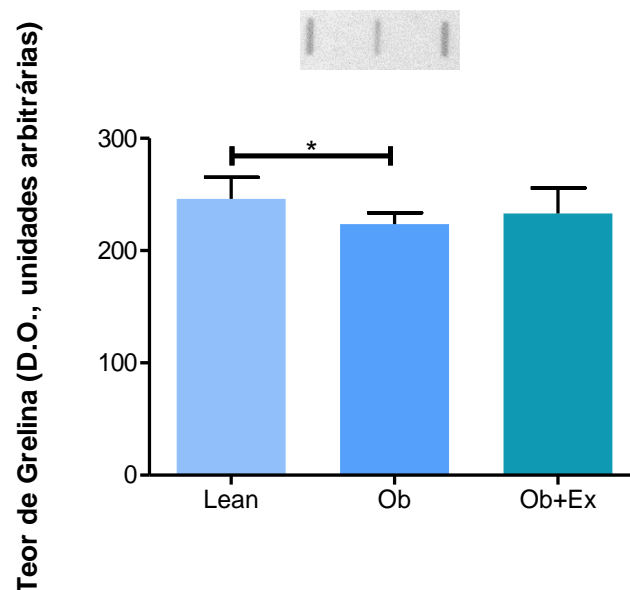


Figura 9- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de grelina avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico correspondente. Os valores são expressos como média±desvio padrão (* $p < 0,05$ vs *Lean*).

A análise dos níveis plasmáticos de leptina não evidenciou alterações significativas entre os grupos experimentais, sendo que o exercício físico não influenciou esta tendência (**Figura 10**). Estes resultados não foram os esperados atendendo a que esta adipocina é produzida no tecido adiposo e os seus níveis são proporcionais à massa do tecido adiposo que está aumentado em animais obesos (107). Nos sujeitos obesos é esperado observar um quadro de resistência à leptina, ou seja, grandes quantidades de leptina em circulação, mas o seu efeito na saciedade e inibição do apetite não se verifica. Os níveis de leptina mostram um padrão diurno e são influenciados pelo sexo, idade e captação de glucose, o que pode ter influenciado os resultados obtidos, visto não ter havido o aumento esperado de leptina nos indivíduos obesos (114). Com a prática de exercício físico seria esperado observar uma diminuição dos níveis desta adipocina (113), o que também não se verificou. Fatores como a intensidade e a duração do exercício físico, o estado nutricional do animal, o ritmo circadiano da leptina e o desequilíbrio calórico imposto pelo exercício podem ter influenciado os resultados obtidos (115).

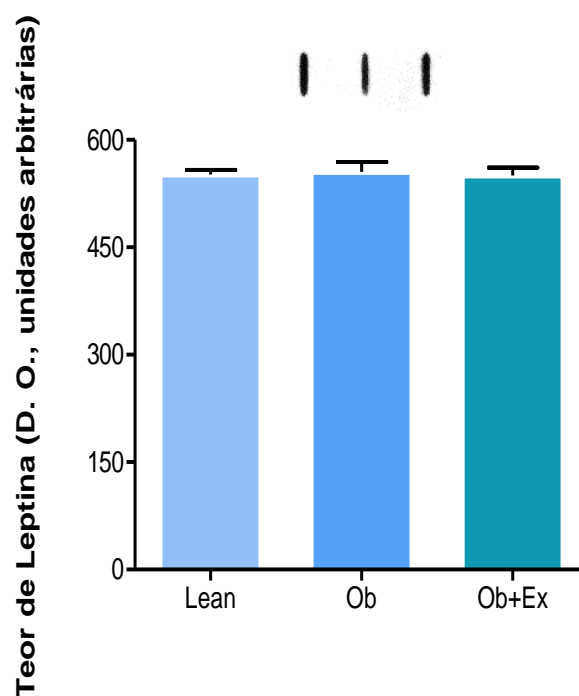


Figura 10- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de leptina avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico correspondente. Os valores são expressos como média±desvio padrão.

1.3. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA OBESIDADE E DA ATIVIDADE FÍSICA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

As complicações associadas à obesidade tendem a ser inicialmente sinalizadas por processos inflamatórios. O tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias, sendo que estas estão associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (116–118). No sentido de melhor compreender a associação entre obesidade, metabolismo e inflamação, determinou-se o teor plasmático de marcadores como a HSL, a PCR, a IL-6 e o TWEAK. Os resultados da análise da lipase HSL que regula o metabolismo do tecido adiposo evidenciou níveis 72% significativamente mais baixos em animais obesos comparativamente aos magros ($p < 0,001$ vs *Lean*; **Figura 11**). No tecido adiposo esta lipase hidrolisa os TG armazenados em ácidos gordos livres. Sendo a HSL uma enzima

chave na função do adipócito foi demonstrado que a sua atividade, bem como a sua concentração encontram-se reduzidas em indivíduos obesos comparativamente a não-obesos (119), o que suporta os resultados obtidos no plasma. Esta enzima é regulada no tecido adiposo pela insulina pelo que os indivíduos obesos que apresentam resistência à insulina vão exibir níveis menores de HSL que parecem estar relacionados com as disfunções endócrinas associadas à obesidade (120). Os menores níveis desta enzima no tecido adiposo poderá justificar os valores observados no plasma decorrentes do *turnover* celular. O exercício físico influenciou significativamente esta tendência, visto que houve um aumento de 64% do teor de HSL em relação aos animais obesos ($p < 0,001$ vs *Ob*; **Figura 11**). Este efeito do exercício físico poderá relacionar-se com a atenuação da resistência à insulina associada à obesidade e com a modulação dos níveis de AMPK no tecido adiposo. O exercício físico parece acelerar a hidrólise intracelular de TG através do aumento da atividade da HSL, como sugerido anteriormente (121). De salientar que o teor de lípidos das amostras de plasma dos animais obesos influenciou a imunodeteção desta proteína pelo que se utilizou amostras obtidas da precipitação de proteína total.

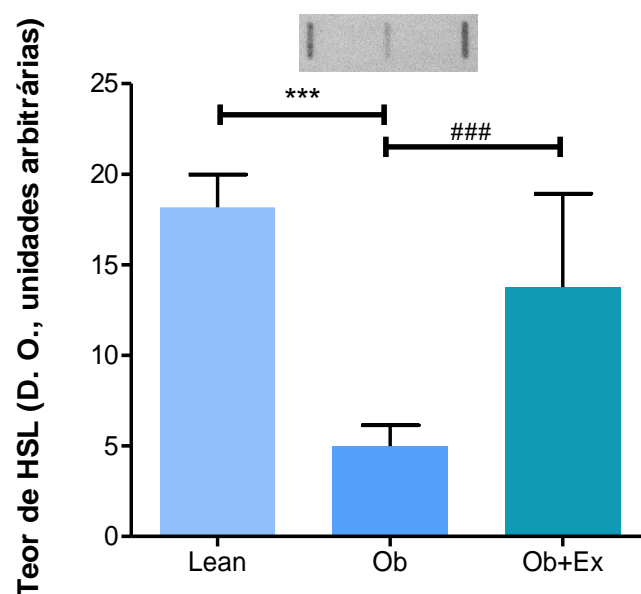


Figura 11- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico e nos níveis plasmáticos de HSL avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico correspondente. Os valores são expressos como média±desvio padrão (** $p < 0,001$ vs *Lean*, ### $p < 0,001$ vs *Ob*).

No sentido de avaliar o perfil inflamatório associado à inflamação mediu-se os níveis da proteína de fase aguda PCR. No entanto, ao contrário do esperado, observou-se uma diminuição significativa dos níveis de PCR nos animais obesos comparativamente aos magros ($p < 0,05$ vs. *Lean*; **Figura 12**). Efetivamente, a PCR é um marcador inflamatório que, geralmente, se encontra em concentrações elevadas em indivíduos obesos, estando associada a um maior risco de doenças cardiovasculares. Os níveis desta proteína de fase aguda são influenciados pelos níveis de IL-6 que se espera serem mais elevados, visto que o tecido adiposo é uma fonte de IL-6 (122,123). Efetivamente, a análise do teor de IL-6 no plasma evidenciou um aumento significativo dos seus níveis, em cerca de 19%, nos indivíduos obesos, comparativamente aos magros ($p < 0,01$ vs. *Lean*; **Figura 13**). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória secretada pelo tecido adiposo, capaz de induzir a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (124). No entanto, os nossos resultados sugerem que a IL-6 não induziu a síntese hepática de PCR, sugerindo que a adiposidade associada à inflamação não parece ser responsável pela modulação dos níveis de PCR, como tem sido sugerido na literatura (125). Alternativamente, fatores metodológicos podem ter influenciado os resultados nomeadamente decorrentes da precipitação da proteína total das amostras de plasma.

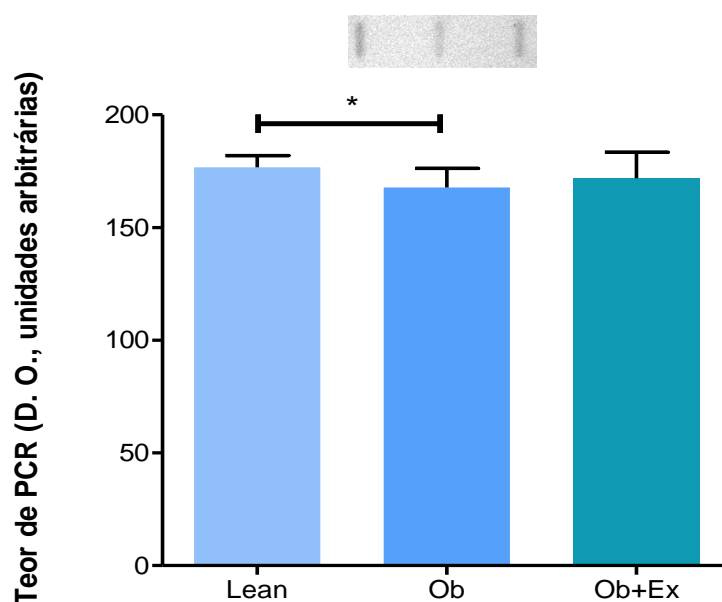


Figura 12- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de PCR avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico correspondente. Os valores são expressos como média±desvio padrão (* $p < 0,05$ vs *Lean*).

O exercício físico não modulou os níveis de PCR (**Figura 12**) mas influenciou significativamente os níveis plasmáticos de IL-6, visto que houve uma diminuição de 46% em relação aos animais obesos ($p < 0,001$ vs *Ob*; **Figura 13**). Em estudos anteriores foi descrita uma diminuição acentuada dos níveis de PCR em resposta ao exercício físico, podendo este atenuar o estado inflamatório associado à obesidade (126,127). Este efeito foi descrito após a prática de exercício físico de resistência, ou de elevada tensão mecânica e curta duração (128), embora também tenha sido demonstrada uma tendência para a redução dos níveis de PCR após a prática de exercício de *endurance* ou de longa duração e baixa tensão mecânica (128). O tipo, a duração e a intensidade de exercício físico parecem influenciar a regulação da resposta inflamatória pelo exercício físico (129), o que poderá justificar a discrepância entre os resultados obtidos e o descrito na literatura. Está documentado que a carga imposta pelo exercício físico agudo aumenta os níveis de IL-6, mas que a prática de exercício físico prolongado é consistente com a diminuição dos níveis de IL-6 (130).

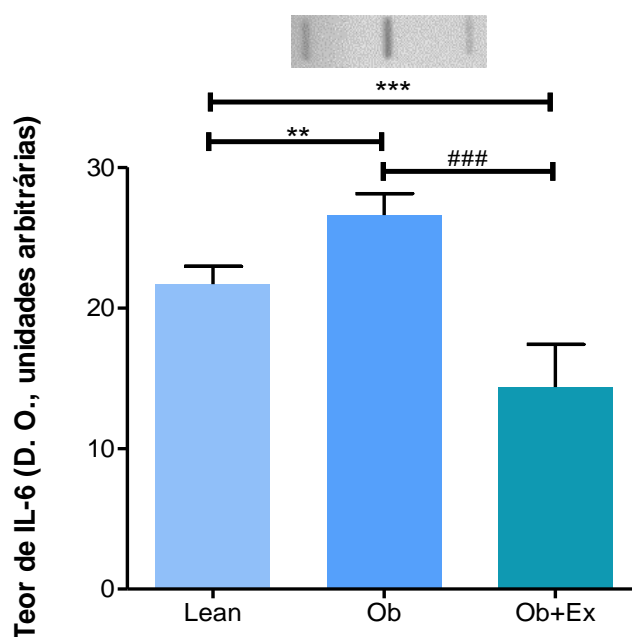


Figura 13- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico e nos níveis plasmáticos de IL-6 avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico correspondente. Os valores são expressos como média±desvio padrão (** $p < 0,01$ vs *Lean*, *** $p < 0,001$ vs *Lean*, ### $p < 0,001$ vs *Ob*).

Recentemente, foi sugerido que o exercício físico modula os níveis da citocina pró-inflamatória TWEAK, com vantagens para a função cardíaca (131). No entanto, dado que não existem dados em obesos exercitados mediram-se os níveis de TWEAK no plasma dos animais dos vários grupos experimentais. No entanto, não se observaram alterações significativas devidas à obesidade ou à prática de exercício físico (**Figura 14**). Atendendo ao perfil inflamatório associado à obesidade, seria de esperar níveis elevados de TWEAK, à semelhança do observado para a IL-6 que parece regular os níveis de TWEAK (132). No entanto, alguns autores não verificaram alterações significativas dos seus níveis entre animais magros e obesos, visto que o TWEAK parece aumentar significativamente em estados de obesidade mórbida (133). Recentemente foi descrita uma diminuição dos níveis séricos de TWEAK após a prática de exercício físico de longa duração, com vantagens para a função cardíaca (101). Os resultados obtidos sugerem que 4 semanas de exercício físico não modularam os níveis desta citocina em animais obesos. Estudos futuros serão importantes para avaliar se a intensidade e/ou duração do programa de exercício influenciam o perfil inflamatório em obesos, nomeadamente no que se refere ao TWEAK.

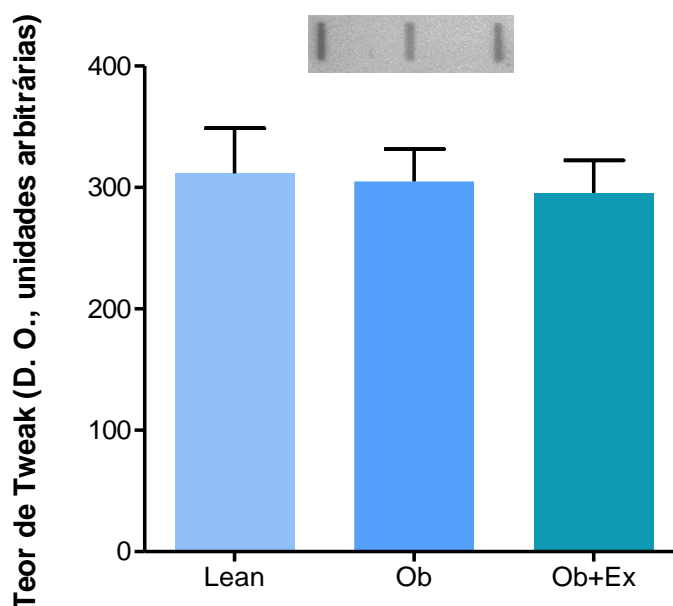


Figura 14- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico e nos níveis plasmáticos de TWEAK avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico correspondente. Os valores são expressos como média±desvio padrão.

O stress oxidativo tem sido associado à resposta inflamatória e resulta de um aumento de espécies reativas de oxigénio cuja ação deletéria não é evitada pelos sistemas antioxidantes (134). Consequentemente ocorrem modificações oxidativas das biomoléculas com impacto negativo na sua função. Entre as modificações que afetam a função das proteínas é de salientar a nitração da tirosina que decorre de níveis elevados de peroxinitrito, uma espécie reativa que se forma da reação entre o anião superóxido e o óxido nítrico, presentes em concentrações mais elevadas na inflamação (135). Curiosamente, os resultados não apontam nesse sentido (**Figura 15**). Associada à obesidade foi descrito um aumento da produção de eNOS no tecido adiposo, com consequente aumento de NO (136). No entanto, sob certas condições pode haver um aumento de anião superóxido muito superior ao de NO, como descrito em casos de hipercolesterolemia, ocorrendo outro tipo de modificações oxidativas como a carbonilação de proteínas (137,138). Os níveis muito elevados de colesterol observados nos animais obesos, sugestivos de hipercolesterolemia, parecem apontar para a ocorrência de outro tipo de modificações oxidativas associadas ao stress oxidativo subjacente à obesidade. No futuro será importante corroborar esta hipótese.

A nitração de proteínas decorrente da prática de exercício físico tem sido justificada pelo aumento significativo de NO no músculo-esquelético, dado que o exercício físico regula a expressão e a atividade da eNOS (138). No entanto, foi descrita uma diminuição da produção de eNOS e, consequentemente, de NO e de proteínas nitradas após a prática de exercício físico intenso (139). Por outro lado, o processo de nitração das proteínas parece ser altamente seletivo (140) pelo que mais do que avaliar o teor de proteínas nitradas, a identificação das proteínas alvo desta modificação oxidativa em resposta ao exercício físico poderá ser mais importante para determinar o potencial impacto funcional desta modificação.

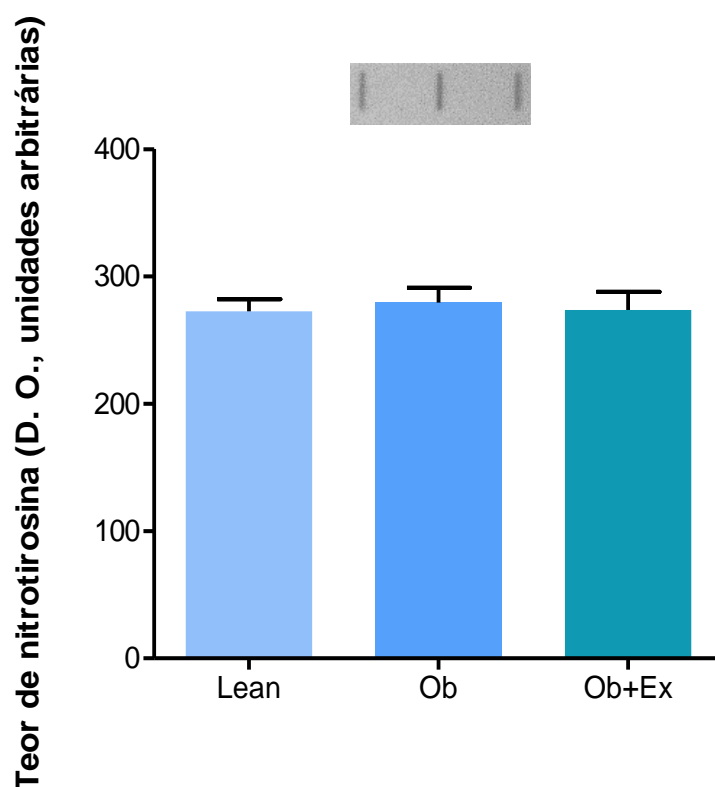


Figura 15- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de proteínas nitradas avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico. Os valores são expressos como média±desvio padrão.

A irisina é uma miocina induzida pelo exercício físico produzida pelo músculo-esquelético e que opera sobre o tecido adiposo, modulando a metabolização de lípidos. Ao nível cardíaco, esta miocina que é altamente expressa no miocárdio parece ter uma ação cardioprotetora (141,142). No sentido de melhor compreender o papel desta miocina na obesidade e de como o exercício físico afeta a sua função mediram-se os seus níveis plasmáticos nos animais dos diferentes grupos experimentais. Nesta análise utilizaram-se amostras obtidas após precipitação da proteína total, à semelhança do efetuado em análises anteriores. Os resultados obtidos evidenciaram níveis de irisina 14% significativamente mais baixos em animais obesos comparativamente aos magros ($p < 0,01$ vs *Lean*; **Figura 16**). O exercício físico influenciou esta tendência, visto que houve

um aumento significativo de 13% em relação aos animais obesos ($p < 0,01$ vs *Ob*; **Figura 16**), para níveis da gama dos observados nos animais do grupo *Lean*.

A irisina encontra-se em níveis bastante baixos no tecido adiposo em comparação com o músculo-esquelético, pelo que é expectável que indivíduos obesos apresentem níveis baixos de irisina (141). A irisina reduz o nível de glucose no sangue, pelo que previne a resistência à insulina e aumenta o gasto energético. O efeito da irisina na lipólise pode ter um efeito metabólico benéfico na redução do tecido adiposo (143). Recentemente foi descrito o aumento significativo dos níveis de irisina após o treino de *endurance* em humanos (141), o que suporta os resultados obtidos no presente estudo. Assim, o exercício físico ao aumentar os níveis de irisina nos animais obesos poderá ter um impacto cardioprotetor, justificando os resultados funcionais obtidos na avaliação da função cardíaca que apontaram para a prevenção da disfunção cardíaca associada à obesidade (resultados não apresentados).

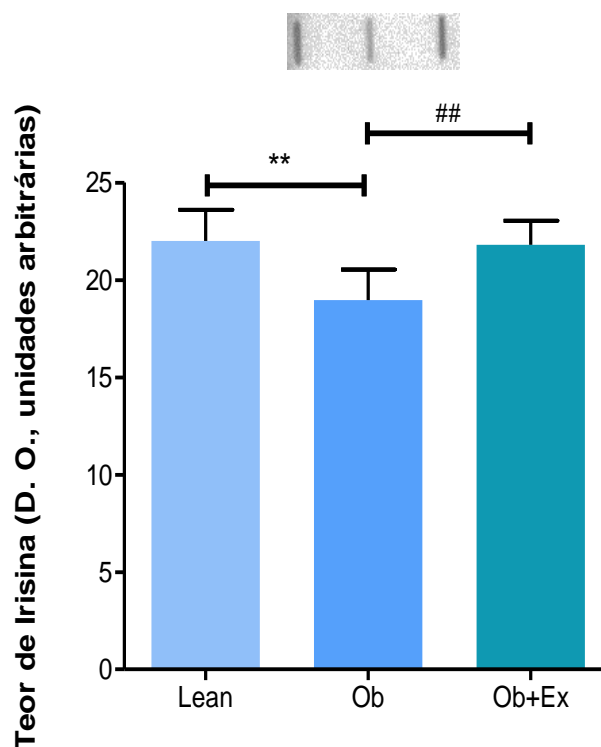


Figura 16- Efeito da obesidade e/ou do exercício físico nos níveis plasmáticos de irisina avaliado pelo slot blot.

Um *immunoblot* representativo dos resultados obtidos é apresentado acima do gráfico. Os valores são expressos como média±desvio padrão (** $p < 0,01$ vs *Lean*, ## $p < 0,01$ vs *Ob*).

VI. CONCLUSÕES

No sentido de avaliar o papel do exercício físico na obesidade, assim como no risco de doenças cardiovasculares, avaliou-se os níveis de hormonas diretamente associadas ao controlo do apetite como a adiponectina, a grelina e a leptina e a presença de marcadores inflamatórios como a HSL, a PCR, a IL-6 e o TWEAK. Para tal delineou-se um protocolo experimental que envolveu três grupos experimentais, ratos ZSF1 magros, ratos ZSF1 obesos e ratos ZSF1 obesos submetidos a um protocolo de exercício físico. Os resultados obtidos permitiram tirar as seguintes conclusões:

- i) Quatro semanas de exercício físico não modularam significativamente os níveis plasmáticos de CT, proteína total bem como de TG nos animais obesos;
- ii) O exercício físico não modulou os níveis plasmáticos de grelina e de adiponectina, significativamente mais baixos em animais obesos comparativamente aos magros. Os níveis plasmáticos de leptina não foram influenciados pela obesidade nem pela atividade física;
- iii) Os níveis significativamente mais baixos de HSL observados nos ratos obesos foram modulados pelo exercício físico, sugerindo um aumento do *turnover* de TG induzido pela atividade física no tecido adiposo;
- iv) Apesar de não se terem observado alterações dos níveis de PCR, de TWEAK e do teor de proteínas nitradas com a obesidade e com a prática de atividade física, 4 semanas de exercício em tapete rolante contrariaram o aumento significativo de IL-6 associado à obesidade, suportando o efeito anti-inflamatório que tem sido associado à atividade física;
- v) O exercício físico contrariou a diminuição dos níveis da miocina irisina induzida pela obesidade, uma ação que parece mediar o efeito cardioprotetor do exercício físico em indivíduos obesos.

De um modo geral, pode-se concluir que o exercício físico tem um efeito benéfico em obesos por modular o estado inflamatório, o metabolismo do tecido adiposo e aumentar o teor de moléculas cardioprotetoras como a irisina. Estudos futuros serão importantes para avaliar o efeito de diferentes programas de exercício físico, com intensidades e

duração diferentes, em diferentes modelos animais de obesidade, para averiguar a especificidade da resposta ao exercício físico.

VII. BIBLIOGRAFIA

- (1) World Health Organization. (2015) Obesity and overweight. Acedido em 8 de Janeiro de 2015; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. **Obesity and overweight.**
- (2) Whitlock, E. P., Williams, S. B., Gold, R., Smith, P. R., and Shipman, S. A. (2005) **Screening and interventions for childhood overweight: a summary of evidence for the US preventive services task force.** *Pediatrics* 116, e125–144.
- (3) Han, J. C., Lawlor, D. A., and Kimm, S. Y. S. (2010) **Childhood obesity.** *Lancet* 375, 1737–1748.
- (4) Sutherland, E. R. (2008) **Obesity and asthma.** *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 28, 589–602, ix.
- (5) Biro, F. M., and Wien, M. (2010) **Childhood obesity and adult morbidities.** *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1499S–1505S.
- (6) Deoke, A. (2012) **Prevalence of overweight in high school students with special reference to cardiovascular efficiency.** *Glob. J. Health Sci.* 4, 147–152.
- (7) World Health Organization. (2000) **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.** *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 894, i–xii, 1–253.
- (8) Bharati, D. R., Deshmukh, P. R., and Garg, B. S. (2008) **Correlates of overweight & obesity among school going children of Wardha city, Central India.** *Indian J. Med. Res.* 127, 539–543.
- (9) Federation, H. (2011) **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.** *World Heal. Organ.* 36–38.
- (10) World Health Organization. (2008) **The global burden of disease 2004 uptade.** 8,48.

- (11) Rocha, T., Rocha, E., Alves, A. C., Medeiros, A. M., Francisco, V., Silva, S., Mendes Gaspar, I., Rato, Q., and Bourbon, M. (2014) **Cardiovascular risk profile of high school students: a cross-sectional study.** *Port. J. Cardiol. an Off. J. Port. Soc. Cardiol.* xxx, 1–10.
- (12) Wang, Z., and Nakayama, T. (2010) **Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease.** *Mediators Inflamm.* 2010, 1–17.
- (13) Weisberg, S. P., Mccann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W. (2003) **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808.
- (14) Berg, A. H., and Scherer, P. E. (2005) **Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease.** *Circ. Res.* 96, 939–949.
- (15) Mathew, M., Tay, E., and Cusi, K. (2010) **Elevated plasma free fatty acids increase cardiovascular risk by inducing plasma biomarkers of endothelial activation, myeloperoxidase and PAI-1 in healthy subjects.** *Cardiovasc. Diabetol.* 9, 1–9.
- (16) Boden, G. (2008) **Obesity and free fatty acids.** *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37, 635–646.
- (17) Shoelson, S. E., Lee, J., and Yuan, M. (2003) **Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance.** *Int. J. Obes.* 27, S49–S52.
- (18) Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., and Walsh, K. (2012) **Adipokines in inflammation and metabolic disease.** *Nat. Rev. Immunol.* 11, 85–97.
- (19) Van Gaal, L. F., Mertens, I. L., and De Block, C. E. (2006) **Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease.** *Nature* 444, 875–880.
- (20) Poitou, C., Viguerie, N., Cancellu, R., De Matteis, R., Cinti, S., Stich, V., Coussieu, C., Gauthier, E., Courtine, M., Zucker, J. D., Barsh, G. S., Saris, W., Bruneval, P., Basdevant, A., Langin, D., and Clément, K. (2005) **Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition.** *Diabetologia* 48, 519–528.

- (21) Lobato, N. S., Filgueira, F. P., Akamine, E. H., Tostes, R. C., Carvalho, M. H. C., and Fortes, Z. B. (2012) **Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity-associated hypertension.** *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 45, 392–400.
- (22) Traupe, T., D’Uscio, L. V, Muentner, K., Morawietz, H., Vetter, W., and Barton, M. (2002) **Effects of obesity on endothelium-dependent reactivity during acute nitric oxide synthase inhibition: modulatory role of endothelin.** *Clin. Sci.* 103, 13S–15S.
- (23) Singhal, A. (2005) **Endothelial dysfunction: role in obesity-related disorders and the early origins of CVD.** *Proc. Nutr. Soc.* 64, 15–22.
- (24) Karalis, K. P., Giannogonas, P., Kodela, E., Koutmani, Y., Zoumakis, M., and Teli, T. (2009) **Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress.** *FEBS J.* 276, 5747–5754.
- (25) Aggoun, Y. (2007) **Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease.** *Pediatr. Res.* 61, 653–659.
- (26) Shetty, S., Kusminski, C. M., and Scherer, P. E. (2009) **Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies.** *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 234–239.
- (27) Peake, P. W., Kriketos, A. D., Campbell, L. V, Shen, Y., and Charlesworth, J. A. (2005) **The metabolism of isoforms of human adiponectin: studies in human subjects and in experimental animals.** *Eur. J. Endocrinol.* 153, 409–417.
- (28) Takemura, Y., Walsh, K., and Ouchi, N. (2007) **Adiponectin and cardiovascular inflammatory responses.** *Curr. Atheroscler. Rep.* 9, 238–243.
- (29) Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. (2003) **Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1045–1050.
- (30) Thundyil, J., Tang, S.-C., Okun, E., Shah, K., Karamyan, V. T., Li, Y.-I., Woodruff, T. M., Taylor, S. M., Jo, D.-G., Mattson, M. P., and Arumugam, T. V. (2010) **Evidence that adiponectin receptor 1 activation exacerbates ischemic neuronal death.** *Exp. Transl. Stroke Med.* 2, 1–8.

- (31) Kadowaki, T., Yamauchi, T., and Kubota, N. (2008) **The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS.** *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 582, 74–80.
- (32) Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B. B., and Kadowaki, T. (2002) **Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.** *Nat. Med.* 8, 1288–1295.
- (33) Lage, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., and López, M. (2008) **AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis.** *Trends Mol. Med.* 14, 539–549.
- (34) Deepa, S. S., and Dong, L. Q. (2009) **APPL1: role in adiponectin signaling and beyond.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E22–E36.
- (35) Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Kumagai, K., Kozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Awazawa, M., Takamoto, I., Froguel, P., Hara, K., Tobe, K., Nagai, R., Ueki, K., and Kadowaki, T. (2007) **Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions.** *Nat. Med.* 13, 332–339.
- (36) Uchi, N. O. O., Hashi, K. O. J. I. O., Hibata, R. E. I. S., and Urohara, T. O. M. (2012) **Adipocytokines and obesity-linked disorders.** *Nagoya J. Med. Sci.* 74, 19–30.
- (37) Hopkins, T. A., Ouchi, N., Shibata, R., and Walsh, K. (2008) **Adiponectin actions in the cardiovascular system.** *Cardiovasc. Res.* 74, 11–18.
- (38) Shimizu, H., Oh-I, S., Okada, S., and Mori, M. (2007) **Leptin resistance and obesity.** *Endocr. J.* 54, 17–26.
- (39) Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001) **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.** *Nature* 414, 799–806.

- (40) Rodríguez, A., Fortuño, A., Gómez-Ambrosi, J., Zalba, G., Díez, J., and Frühbeck, G. (2007) **The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism.** *Endocrinology* 148, 324–331.
- (41) Carvalho-filho, M. A., Ueno, M., Hirabara, S. M., Seabra, A. B., Carvalheira, B. C., Oliveira, M. G. De, Velloso, A., Curi, R., and Saad, M. J. A. (2005) **S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance.** *Diabetes* 54, 959–967.
- (42) De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J. A., and Velloso, L. A. (2005) **Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus.** *Endocrinology* 146, 4192–4199.
- (43) Antoniades, C., Tousoulis, D., Tentolouris, C., Toutouzas, P., and Stefanadis, C. (2003) **Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice.** *Herz* 28, 628–638.
- (44) Vaziri, N. D. (2004) **Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension.** *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 13, 93–99.
- (45) Espiritu, D. J., and Mazzone, T. (2008) **Oxidative stress regulates adipocyte apolipoprotein E and suppresses its expression in obesity.** *Diabetes* 57, 2992–2998.
- (46) Lesnefsky, E. J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J., and Hoppel, C. L. (2001) **Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia–reperfusion, aging, and heart failure.** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1065–1089.
- (47) Boudina, S., Sena, S., Theobald, H., Sheng, X., Wright, J. J., Hu, X. X., Aziz, S., Johnson, J. I., Bugger, H., Zaha, V. G., and Abel, E. D. (2007) **Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins.** *Diabetes* 56, 2457–2466.
- (48) Xu, Q., Konta, T., Nakayama, K., Furusu, A., Moreno-Manzano, V., Lucio-Cazana, J., Ishikawa, Y., Fine, L. G., Yao, J., and Kitamura, M. (2004) **Cellular defense against H₂O₂-induced apoptosis via MAP kinase-MKP-1 pathway.** *Free Radic. Biol. Med.* 36, 985–993.

- (49) Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim, J., and Carosella, A. M. (2001) **Correlates of markers of oxidative status in the general population.** *Am. J. Epidemiol.* 154, 348–356.
- (50) Veal, E. A., Day, A. M., and Morgan, B. A. (2007) **Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling.** *Mol. Cell* 26, 1–14.
- (51) Singhal, A., Cole, T. J., Fewtrell, M., Deanfield, J., and Lucas, A. (2004) **Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health?** *Circulation* 109, 1108–1113.
- (52) Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B. D., and Palin, M.-F. (2010) **Adiponectin action from head to toe.** *Endocrine* 37, 11–32.
- (53) Musaad, S., and Haynes, E. N. (2007) **Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events.** *Epidemiol. Rev.* 29, 98–114.
- (54) Hu, F. (2008) **Physical activity, sedentary behaviours, and obesity,** *Obesity Epidemiology*, 301-319. Oxford University Press, New York, NY.
- (55) Myers, J. (2003) **Exercise and cardiovascular health.** *Circulation* 107, 2e–5.
- (56) Mann, N., and Rosenzweig, A. (2012) **Can exercise teach us how to treat heart disease?** *Circulation* 126, 2625–2635.
- (57) Hambrecht, R., Wolf, A., Gielen, S., Linke, A., Hoffer, J., Erbs, S., Schoene, N., and Schuler, G. (2000) **Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease.** *N. Engl. J. Med.* 342, 454–460.
- (58) Herd, S. L., Kiens, B., Boobis, L. H., and Hardman, A. E. (2001) **Moderate exercise, postprandial lipemia, and skeletal muscle lipoprotein lipase activity.** *Metabolism.* 50, 756–762.
- (59) Chakravarthy, M. V., Joyner, M. J., and Booth, F. W. (2002) **An obligation for primary care physicians to prescribe physical activity to sedentary patients to reduce the risk of chronic health conditions.** *Mayo Clin. Proc.* 77, 165–173.
- (60) Goodyear, L. J., and Kahn, B. B. (1998) **Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity.** *Annu. Rev. Med.* 49, 235–261.

- (61) LeMaitre, J. P., Harris, S., Fox, K. A. ., and Denvir, M. (2004) **Change in circulating -cytokines after 2 forms of exercise training in chronic stable heart failure.** *Am. Heart J.* 147, 100–105.
- (62) Damy, T., Ratajczak, P., Shah, A. M., Camors, E., Marty, I., Hasenfuss, G., Marotte, F., Samuel, J.-L., and Heymes, C. (2004) **Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart.** *Lancet* 363, 1365–1367.
- (63) Liu, J.-L., Irvine, S., Reid, I. A., Patel, K. P., and Zucker, I. H. (2000) **Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure : a role for angiotensin II.** *Circulation* 102, 1854–1862.
- (64) Batista, M. L., Santos, R. V. T., Lopes, R. D., Lopes, A. C., Costa Rosa, L. F. B. P., and Seelaender, M. C. L. (2008) **Endurance training modulates lymphocyte function in rats with post-MI CHF.** *Med. Sci. Sports Exerc.* 40, 549–556.
- (65) Golbidi, S., and Laher, I. (2012) **Exercise and the cardiovascular system.** *Cardiol. Res. Pract.* 1, 1–15.
- (66) Nunes, R. B., Tonetto, M., Machado, N., Chazan, M., Heck, T. G., Veiga, A. B. G., and Dall'Ago, P. (2008) **Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats.** *J. Appl. Physiol.* 104, 1641–1647.
- (67) Souza-rabbo, M. P., Araújo, A. S. R., Fernandes, T. R. G., and Oliveira, A. R. (2004) **Influence of exercise training frequency on cardiac and hepatic oxidative stress in rats.** *Exp. Clin. Cardiol.* 8, 201–205.
- (68) Flagg, T. P., Enkvetchakul, D., Koster, J. C., and Nichols, C. G. (2010) **Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection.** *Physiol. Rev.* 90, 799–829.
- (69) Zingman, L. V, Zhu, Z., Sierra, A., Stepniak, E., Burnett, C. M.-L., Maksymov, G., Anderson, M. E., Coetzee, W. A., and Hodgson-Zingman, D. M. (2011) **Exercise-induced expression of cardiac ATP-sensitive potassium channels promotes action potential shortening and energy conservation.** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 72–81.

- (70) Thompson, P. D., Buchner, D., Pina, I. L., Balady, G. J., Williams, M. a, Marcus, B. H., Berra, K., Blair, S. N., Costa, F., Franklin, B., Fletcher, G. F., Gordon, N. F., Pate, R. R., Rodriguez, B. L., Yancey, A. K., and Wenger, N. K. (2003) **Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the council on clinical cardiology and the council on nutrition, physical activity, and metabolism.** *Circulation* 107, 3109–3116.
- (71) World Health Organization. (2011) **Global recommendations on physical activity for health** 15–33.
- (72) Mirat, J. (2007) **Physical activity in the prevention and treatment of cardiovascular diseases.** *Acta Med. Croatica* 61, 63–67.
- (73) Gielen, S., Schuler, G., and Adams, V. (2010) **Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms.** *Circulation* 122, 1221–1238.
- (74) Haykowsky, M. J., Liang, Y., Pechter, D., Jones, L. W., McAlister, F. A., and Clark, A. M. (2007) **A meta-analysis of the effect of exercise training on left ventricular remodeling in heart failure patients: the benefit depends on the type of training performed.** *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 2329–2336.
- (75) Sachdev, S., and Davies, K. J. A. (2008) **Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise.** *Free Radic. Biol. Med.* 44, 215–223.
- (76) Hamilton, K. L., Staib, J. L., Phillips, T., Hess, A., Lennon, S. L., and Powers, S. K. (2003) **Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion.** *Free Radic. Biol. Med.* 34, 800–809.
- (77) Frederico, M. J. S., Justo, S. L., Da Luz, G., Da Silva, S., Medeiros, C., Barbosa, V. A., Silva, L. A., Boeck, C. R., De Pinho, R. A., and De Souza, C. T. (2009) **Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol.** *Free Radic. Res.* 43, 957–964.
- (78) Ascensão, A., Ferreira, R., and Magalhães, J. (2007) **Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria.** *Int. J. Cardiol.* 117, 16–30.

- (79) Kenney, W. L., Wilmore, J. H., and Costill, D. L. (2012) **Physiology of sport and exercise**. 182-196, 5th ed. Human Kinetics, Champaign, IL.
- (80) Ferreira, R., Vitorino, R., Padrão, A. I., Espadas, G., Mancuso, F. M., Moreira-Gonçalves, D., Castro-Sousa, G., Henriques-Coelho, T., Oliveira, P. A., Barros, A. S., Duarte, J. A., Sabidó, E., and Amado, F. (2014) **Lifelong exercise training modulates cardiac mitochondrial phosphoproteome in rats**. *J. Proteome Res.* 13, 2045–2055.
- (81) Lee, S., Park, Y., Dellsperger, K. C., and Zhang, C. (2011) **Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice**. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* 301, 306–314.
- (82) Yan, Z., Lira, V. A., and Greene, N. P. (2012) **Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality**. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 40, 159–164.
- (83) Lehnen, M. A., Angelis, D. K., Markoski, M. M., and Schaan, D. B. (2012) **Changes in the GLUT4 expression by acute exercise, exercise training and detraining in experimental models**. *J. Diabetes Metab.* 10, 1–8.
- (84) Owen, K. L., Pretorius, L., and McMullen, J. R. (2009) **The protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase (p110 α) in the failing heart**. *Clin. Sci.* 116, 365–375.
- (85) Kim, H. M., Park, J., Kim, H.-S., Kim, D. H., and Park, S. H. (2006) **Obesity and cardiovascular risk factors in Korean children and adolescents aged 10-18 years from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey, 1998 and 2001**. *Am. J. Epidemiol.* 164, 787–793.
- (86) Skinner, A. C., Steiner, M. J., Henderson, F. W., and Perrin, E. M. (2010) **Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood**. *Pediatrics* 125, e801–e809.
- (87) Willerson, J. T., and Ridker, P. M. (2004) **Inflammation as a cardiovascular risk factor**. *Circulation* 109, II2–II10.
- (88) Martins E Silva, J., and Saldanha, C. (2007) **Factores de risco cardiovascular: componentes hemorreológicos e hemostasiológicos**. *Rev. Port. Cardiol.* 26, 161–182.

- (89) Darvall, K. A. L., Sam, R. C., Silverman, S. H., Bradbury, A. W., and Adam, D. J. (2007) **Obesity and thrombosis.** *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 33, 223–233.
- (90) Rauchhaus, M., Doehner, W., Francis, D. P., Davos, C., Kemp, M., Liebenthal, C., Niebauer, J., Hooper, J., Volk, H., Coats, A. J. S., and Anker, S. D. (2000) **Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure.** *Circulation* 102, 3060–3067.
- (91) González, M., Ruiz-ros, J. A., Pérez-paredes, M., Lozano, M. L., Carnero, A., Cubero, T., González, J. J., Ureña, I., and Vicente, V. (2007) **Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in patients with ST-segment elevation acute myocardial.** *Rev. Española Cardiol.* 60, 1233–1241.
- (92) Baldus, S., Heeschen, C., Meinertz, T., Zeiher, A. M., Eiserich, J. P., Münzel, T., Simoons, M. L., and Hamm, C. W. (2003) **Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes.** *Circulation* 108, 1440–1445.
- (93) Lee, J. H., Bullen, J. W., Stoyneva, V. L., and Mantzoros, C. S. (2005) **Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E625–E632.
- (94) Codoñer-Franch, P., Tavárez-Alonso, S., Porcar-Almela, M., Navarro-Solera, M., Arilla-Codoñer, Á., and Alonso-Iglesias, E. (2014) **Plasma resistin levels are associated with homocysteine, endothelial activation, and nitrosative stress in obese youths.** *Clin. Biochem.* 47, 44–48.
- (95) Aggoun, Y. (2007) **Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease.** *Pediatr. Res.* 61, 653–659.
- (96) de Lemos, J. A., McGuire, D. K., and Drazner, M. H. (2003) **B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease.** *Lancet* 362, 316–322.
- (97) Tofovic, S. P., Salah, E. M., Jackson, E. K., and Melhem, M. (2007) **Early renal injury induced by caffeine consumption in obese, diabetic ZSF1 rats.** *Ren. Fail.* 29, 891–902.

- (98) Pitsavos, C., Chrysoshoou, C., Koutroumbi, M., Aggeli, C., Kourlaba, G., Panagiotakos, D., Michaelides, A., and Stefanadis, C. (2011) **The impact of moderate aerobic physical training on left ventricular mass, exercise capacity and blood pressure response during treadmill testing in borderline and mildly hypertensive males.** *Hell. J. Cardiol.* 52, 6–14.
- (99) Dohm, G. L., Beecher, G. R., Stephenson, T. P., and Womack, M. (1977) **Adaptations to endurance training at three intensities of exercise.** *J. Appl. Physiol.* 42, 753–757.
- (100) Ochi, E., Kazunori Nosaka, B., Arata Tsutaki, B., Karina Kouzaki, B., and Koichi Nakazato, B. (2015) **Repeated bouts of fast velocity eccentric contractions induce atrophy of gastrocnemius muscle in rats.** *J. Muscle Res. Cell Motil.*
- (101) Padrao, A. I., Moreira-Goncalves, D., Oliveira, P. A., Teixeira, C., Faustino-Rocha, A. I., Helguero, L., Vitorino, R., Santos, L. L., Amado, F., Duarte, J. A., and Ferreira, R. (2015) **Endurance training prevents TWEAK but not myostatin-mediated cardiac remodelling in cancer cachexia.** *Arch Biochem Biophys* 567, 13–21.
- (102) van Wijk, J. P., Halkes, C. J., Erkelens, D., and Castro Cabezas, M. (2003) **Fasting and daylong triglycerides in obesity with and without type 2 diabetes.** *Metabolism* 52, 1043–1049.
- (103) Miettinen, T. A. (1971) **Cholesterol production in obesity.** *Circulation* 44, 842–850.
- (104) Sung, R. Y. T., Yu, C. W., Chang, S. K. Y., Mo, S. W., Woo, K. S., and Lam, C. W. K. (2002) **Effects of dietary intervention and strength training on blood lipid level in obese children.** *Arch. Dis. Child.* 86, 407–410.
- (105) Bermingham, M. A., Jones, E., Steinbeck, K., and Brock, K. (1995) **Plasma cholesterol and other cardiac risk factors in adolescent girls.** *Arch. Dis. Child.* 73, 392–397.
- (106) Strong, W. B., Malina, R. M., Blimkie, C. J. R., Daniels, S. R., Dishman, R. K., Gutin, B., Hergenroeder, A. C., Must, A., Nixon, P. A., Pivarnik, J. M., Rowland, T., Trost, S., and Trudeau, F. (2005) **Evidence based physical activity for school-age youth.** *J. Pediatr.* 146, 732–737.

- (107) Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C., and Lima, F. B. (2006) **O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo.** *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 50, 216–229.
- (108) Saunders, T. J., Palombella, A., McGuire, K. A., Janiszewski, P. M., Després, J.-P., and Ross, R. (2012) **Acute exercise increases adiponectin levels in abdominally obese men.** *J. Nutr. Metab.* 2012, 1–6.
- (109) J.-Y., J., J., H., H.-J., K., M.S., P., D.Y., S., and Y.-S., K. (2013) **The combined effects of physical exercise training and detraining on adiponectin in overweight and obese children.** *Integr. Med. Res.* 2, 145–150.
- (110) Simpson, K. A., and Singh, M. A. F. (2008) **Effects of exercise on adiponectin: a systematic review.** *Obesity* 16, 241–256.
- (111) Tschöp, M., Weyer, C., Tataranni, P. A., Devanarayan, V., Ravussin, E., and Heiman, M. L. (2001) **Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity.** *Diabetes* 50, 707–709.
- (112) Sato, T., Ida, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Kangawa, K., and Kojima, M. (2014) **Physiological roles of ghrelin on obesity.** *Obes. Res. Clin. Pract.* 8, e405–e413.
- (113) Mota, G. R. Da, and Zanesco, A. (2007) **Leptina, grelina e exercício físico.** *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 51, 25–33.
- (114) Klok, M. D., Jakobsdottir, S., and Drent, M. L. (2007) **The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review.** *Obes. Rev.* 8, 21–34.
- (115) Bouassida, A., Zalleg, D., Bouassida, S., Zaouali, M., Feki, Y., Zbidi, A., and Tabka, Z. (2006) **Leptin, its implication in physical exercise and training: a short review.** *J. Sport. Sci. Med.* 5, 172–181.
- (116) Ito, T., and Ikeda, U. (2003) **Inflammatory cytokines and cardiovascular disease.** *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 2, 257–265.
- (117) Vendrell, J., Vilarrasa, N., Molina, A., Go, J. M., Gutie, C., and Molina, a N. a. (2004) **Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines : relationships in obesity.** *Obes. Res.* 12, 962–971.

- (118) Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., and Paquot, N. (2014) **Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes.** *Diabetes Res. Clin. Pract.* 105, 141–150.
- (119) Enevoldsen, L. H., Stallknecht, B., Langfort, J., Petersen, L. N., Holm, C., Ploug, T., and Galbo, H. (2001) **The effect of exercise training on hormone-sensitive lipase in rat intra-abdominal adipose tissue and muscle.** *J. Physiol.* 536, 871–877.
- (120) You, T., Wang, X., Yang, R., Lyles, M. F., Gong, D., and Nicklas, B. J. (2012) **Effect of exercise training intensity on adipose tissue hormone sensitive lipase gene expression in obese women under weight loss.** *J. Sport Heal. Sci.* 1, 184–190.
- (121) Ogasawara, J., Izawa, T., Sakurai, T., Shirato, K., Ishibashi, Y., Ohira, Y., Ishida, H., Ohno, H., and Kizaki, T. (2015) **Habitual exercise training acts as a physiological stimulator for constant activation of lipolytic enzymes in rat primary white adipocytes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 348–353.
- (122) Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D. A., Emeis, J. J., and Coppack, S. W. (1999) **C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity , insulin resistance , and endothelial dysfunction. A potential role for cytokines originating from adipose tissue?** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 972–978.
- (123) Visser, M., Mcquillan, G. M., Wener, M. H., and Harris, T. B. (1999) **Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults.** *J. Am. Med. Assoc.* 282, 2131–2135.
- (124) Oliveira, J. de S., and Bressan, J. (2010) **Tecido adiposo como regulador da inflamação e da obesidade.** *EFDdeportes.com, Rev. Digit.* 150.
- (125) Mclaughlin, T., Abbasi, F., Lamendola, C., Liang, L., Reaven, G., Schaaf, P., and Reaven, P. (2002) **Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein.** *Circulation* 106, 2908–2913.
- (126) Lakka, T. A., Lakka, H.-M., Rankinen, T., Leon, A. S., Rao, D. C., Skinner, J. S., Wilmore, J. H., and Bouchard, C. (2005) **Effect of exercise training on plasma levels of C-reactive protein in healthy adults: the HERITAGE Family Study.** *Eur. Heart J.* 26, 2018–2025.

- (127) Ford, E. S. (2002) **Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults.** *Lippincott Williams & Wilkins* 13, 561–568.
- (128) Donges, C. E., Duffield, R., and Drinkwater, E. J. (2010) **Effects of resistance or aerobic exercise training on interleukin-6, C-reactive protein, and body composition.** *Med. Sci. Sport. Exerc.* 42, 304–313.
- (129) Fischer, C. P. (2006) **Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?** *Exerc. Immunol. Rev.* 12, 6–33.
- (130) Nicklas, B. J., Hsu, F.-C., Brinkley, T. J., Church, T., Goodpaster, B. H., Kritchevsky, S. B., and Pahor, M. (2008) **Exercise training and plasma C-reactive protein and interleukin-6 in elderly people.** *J. Am. Geriatr. Soc.* 56, 2045–2052.
- (131) Hernández-Romero, D., Jover, E., Martínez, C. M., Andreu-Cayuelas, J. M., Orenes-Piñero, E., Romero-Aniorte, A. I., Casas, T., Cánovas, S., Montero-Argudo, J. A., Valdés, M., de la Morena, G., and Marín, F. (2014) **TWEAK and NT-proBNP levels predict exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy.** *Eur. J. Clin. Invest.* 45, 179–186.
- (132) Vendrell, J., Maymó-Masip, E., Tinahones, F., García-España, A., Megia, A., Caubet, E., García-Fuentes, E., and Chacón, M. R. (2010) **Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2983–2992.
- (133) Chacon, M. R., Richart, C., Gomez, J. M., Megia, A., Vilarrasa, N., Fernandez-Real, J. M., Garcia-Espana, A., Miranda, M., Masdevall, C., Ricard, W., Caubet, E., Soler, J., and Vendrell, J. (2006) **Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity.** *Cytokine* 33, 129–137.
- (134) Codoñer-Franch, P., Tavárez-Alonso, S., Murria-Estal, R., Megías-Vericat, J., Tortajada-Girbés, M., and Alonso-Iglesias, E. (2011) **Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation.** *Atherosclerosis* 215, 475–480.

- (135) Ma, S.-X., Li, X.-Y., Smith, B. T., and Jou, N.-T. (2011) **Changes in nitric oxide, cGMP, and nitrotyrosine concentrations over skin along the meridians in obese subjects.** *Obesity* 19, 1560–1567.
- (136) Silver, A. E., Beske, S. D., Christou, D. D., Donato, A. J., Moreau, K. L., Eskurza, I., Gates, P. E., and Seals, D. R. (2007) **Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47phox expression and evidence of endothelial oxidative stress.** *Circulation* 115, 627–637.
- (137) Dobrian, a D., Davies, M. J., Schriver, S. D., Lauterio, T. J., and Prewitt, R. L. (2001) **Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension.** *Hypertension* 37, 554–560.
- (138) Radák, Z., Ogonovszky, H., Dubecz, J., Pavlik, G., Sasvari, M., Pucsok, J., Berkes, I., Csont, T., and Ferdinandy, P. (2003) **Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels.** *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 726–730.
- (139) Suhr, F., Porten, S., Hertrich, T., Brixius, K., Schmidt, A., Platen, P., and Bloch, W. (2009) **Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes.** *Nitric oxide* 20, 95–103.
- (140) Vassilakopoulos, T., Deckman, G., Kebbewar, M., Rallis, G., Harfouche, R., and Hussain, S. N. a. (2003) **Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L452–L457.
- (141) Kurdiova, T., Balaz, M., Vician, M., Maderova, D., Vlcek, M., Valkovic, L., Srbecky, M., Imrich, R., Kyselovicova, O., Belan, V., Jelok, I., Wolfrum, C., Klimes, I., Krssak, M., Zemkova, E., Gasperikova, D., Ukropec, J., and Ukropcova, B. (2014) **Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies.** *J. Physiol.* 592, 1091–1107.
- (142) Xie, C., Zhang, Y., Tran, T. D. N., Wang, H., Li, S., George, E. V., Zhuang, H., Zhang, P., Kandel, A., Lai, Y., Tang, D., Reeves, W. H., Cheng, H., Ding, Y., and Yang, L.-J. (2015) **Irisin controls growth, intracellular Ca²⁺ signals, and mitochondrial thermogenesis in cardiomyoblasts.** *PLoS One* 10, 1–16.

(143) Xiong, X.-Q., Chen, D., Sun, H.-J., Ding, L., Wang, J.-J., Chen, Q., Li, Y.-H., Zhou, Y.-B., Han, Y., Zhang, F., Gao, X.-Y., Kang, Y.-M., and Zhu, G.-Q. (2015) **FNDC5 overexpression and irisin ameliorates glucose/lipid metabolic derangements and enhances lipolysis in obesity.** *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1867–1875.